



Universidad
de Alcalá

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FISIOTERAPIA

**Base molecular del dopaje con proteínas
recombinantes. Eritropoyetina.**

Revisión Bibliográfica.

ALUMNO: Alberto García Verdes

Alcalá de Henares a 10 de Julio de 2013

TUTORA: Irene Dolores Román Curto

Catedrático de Escuela Universitaria



Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FISIOTERAPIA

**Base molecular del dopaje ccon proteínas
recombinantes. Eritropoyetina.**

Revisión Bibliográfica.

ALUMNO: Alberto García Verdes

Alcalá de Henares a 10 de Julio de 2013

TUTORA: Irene Dolores Román Curto

Catedrático de Escuela Universitaria

Firma del Autor

VºB del Tutor

AGRADECIMIENTOS

En memoria de mi hermano Santos recién fallecido el día 8 de Mayo de 2013 que desde el cielo se sentirá muy orgulloso de que haya logrado alcanzar todos mis objetivos y acabar la carrera que era una de sus grandes ilusiones.

A mis padres, mi hermano y toda mi familia por apoyarme siempre que ha sido necesario; por su paciencia al oírme hablar del tema y por su ayuda incesante para que no me rindiera en ningún momento ni tirara la toalla.

A todos mis amigos, en especial a Andrea, Emilio, Fabio, Irene, Izar, Javi, Laura B, Laura E, Lorena, Luis, Mario, Mónica, Nahuel y Raquel, por su apoyo incondicional en todos los momentos (tanto los buenos, como los más difíciles), por meterme caña cuando lo he necesitado para todos los problemas que hayan podido interceder en el desarrollo del trabajo de fin de grado, por haberme ayudado a no rendirme y haber tirado del carro en alguna ocasión.

A mi tutora por su apoyo y disposición y preocupación en todo momento y su total disponibilidad (para tutorías, aportación de artículos...) que han hecho de este TFG un proyecto más sencillo y hacerme ver un nuevo enfoque de la Bioquímica y del dopaje y el deporte.

Gracias a todos vosotros por hacer que esto haya sido mucho más fácil y llevadero.

RESUMEN

La eritropoyetina es una glicoproteína ácida compuesta por 165 aminoácidos, sintetizada mayoritariamente en los riñones y en menor medida en la médula ósea, el bazo y el hígado. Gracias al desarrollo de la ingeniería genética, cada vez es más habitual la presencia de esta proteína tanto en el ámbito sanitario, como en el deportivo siendo utilizada como método de dopaje.

En el presente trabajo, se estudia la estructura, biosíntesis, función de la proteína, sus diferentes indicaciones clínicas, y los efectos adversos que conlleva el abuso de esta hormona, dentro de los cuales se encuentra el cáncer.

Se exponen las principales estrategias del dopaje con esta hormona, basadas principalmente en el dopaje genético y en la administración de proteínas recombinantes. Se indican los métodos utilizados en el dopaje genético y se explica el complejo proceso de obtención de las proteínas recombinantes, sus características principales y el uso en la mejora del rendimiento deportivo.

En relación con el deporte, se detallan los diferentes métodos de detección de esta proteína en los controles antidopaje (los cuales son cada vez más exhaustivos) y también se exponen los derivados de la eritropoyetina que tienen un efecto más duradero en el organismo y son más difíciles de ser detectada.

De esta manera se trata de acercar al lector al mundo del dopaje, profundizando en el conocimiento de su base molecular e informando sobre los avances que se están llevando a cabo para conseguir una competición más pura y limpia.

Palabras clave: Eritropoyetina, dopaje genético, eritropoyesis, proteínas recombinantes, deporte, rendimiento físico.

ABSTRACT

Erythropoietin is an acidic glycoprotein composed by 165 amino-acids, mainly synthesized in kidneys and in minor proportion in bone marrow, spleen and liver. Due to the development of genetic engineering it is increasingly common the presence of this protein in the scope health and in sport being used like a doping method.

In the present report, the structure, the biosynthesis, the functions, the clinical indications and the adverse effects that are produced by the abuse of this protein, as cancer, are included.

The main strategies of EPO doping are exposed, which are mainly based on gene doping and the administration of recombinant proteins. The most used methods in the gene therapy are indicated and the difficult process to obtain recombinant proteins, their main features and use in performance enhancement are explained.

In relation to sport, the different detection methods of this protein in the anti-doping controls (which are more exhaustive now) and also erythropoietin derivatives as an option of doping substance are exposed, which have a long-lived effect in the organism and are more difficult to detect.

In this manner, the work hope close lector to the doping world, going more deeply into the knowledge of their molecular basis, and give information about the advances that are being done to have a competition more pure and clean in every moment.

Keywords: Erythropoietin, gene doping, erythropoiesis, recombinant proteins, sport, athletic performance.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<u>Página</u>
1. Introducción.	1
1.1. Introducción a la eritropoyetina.	1
1.2. Dopaje: Definición e historia.	2
1.2.1. <i>Definición de dopaje.</i>	2
1.2.2. <i>Historia del dopaje.</i>	2
1.3. Sustancias y métodos prohibidos en el dopaje.	5
2. Dopaje con EPO.	9
2.1. Proteínas recombinantes.	9
2.2. Dopaje genético mediante vectores (transferencia génica).	19
3. Estructura de la EPO.	24
4. Biosíntesis de la EPO.	27
4.1. Gen de la eritropoyetina.	28
5. Acciones biológicas: Eritropoyesis y mecanismo de acción (señalización).	30
5.1. Eritropoyesis.	30
5.2. Mecanismo de acción (Señalización).	33
6. Factores que modulan la producción de EPO: Factor inducible	

por hipoxia (HIF).	36
7. Derivados de la EPO: agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESAs) que se unen a su receptor (EPOR).	40
7.1. Epoetina α .	40
7.2. Epoetina β .	42
7.3. Epoetina ω .	42
7.4. Epoetina δ .	42
7.5. Otras epoetinas.	43
7.6. Darbopoetina α .	43
7.7. CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator).	46
7.8. Hematide.	47
8. Indicaciones clínicas de la EPO.	49
9. Efectos adversos EPO. Cáncer.	52
10. Métodos de detección del dopaje	56
10.1. Métodos indirectos.	56
10.1.1. Hematocrito.	57
10.1.2. Hemoglobina.	57
10.1.3. Reticulocitos.	57
10.2. Métodos directos.	57
10.2.1. Isoelectroenfoque (IEF).	58

10.2.2.	<i>Electroforesis 2D.</i>	64
10.2.3.	<i>Modelo ON/OFF.</i>	65
10.2.4.	<i>Método cromatográfico.</i>	65
10.2.5.	<i>Métodos de espectrometría de masas.</i>	66
10.2.6.	<i>Método de detección por EPO MAIIA.</i>	66
10.2.7.	<i>ABP (Pasaporte hematológico).</i>	68
10.2.8.	<i>Detección EPO CERA.</i>	69
10.2.9.	<i>Detección de la transferencia de genes.</i>	69
10.2.10.	<i>Otros métodos.</i>	71
11.	Material y métodos.	72
12.	Conclusiones.	76
13.	Bibliografía.	78

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Aas: Aminoácidos.

AAS: *Anabolic Androgenic Steroids*. Esteroides anabólicos androgénicos.

ABP: *Athlete Biological Passport*. Pasaporte Biológico del atleta.

AIF: Factor inductor de la apoptosis.

Apaf-1: Factor activador de proteasas apoptóticas – 1.

Arg: Arginina.

Asn: Asparragina.

Bad: *Bcl- 2- associated death promoter*.

Bcl- X_L: *Bcl-2- like protein*.

BD: Base de datos.

BFUe: *Burst forming unit erythroid*. Formador eritroide de unidades de ráfaga.

bGH: *Bovine Growth Hormone*. Hormona de crecimiento bovina.

bHLH: *Basic Helix- Loop- Helix*.

BHK: *Baby hamster kidney*. Riñones de hámster bebé.

C: Citosina.

CBP: Proteína de unión a CREB.

cDNA: *Complementary DNA*. DNA complementario.

CERA: *Continuous Erythropoietin Receptor Activator*. Receptor Activador continuo de eritropoyetina.

CFUe: *Colony forming unit erythroid*. Unidades formadoras de colonias eritroides.

CG: *Chorionic Gonadotropine*. Gonadotropina coriónica.

CHO: *Chinese hámster ovary*. Ovario de hámster chino.

C-IAP2: *Inhibitor of apoptosis proteins – 2*.

Cis: Cisteína.

COI: Comité Olímpico Internacional.

CO₂: Dióxido de carbono.

dATP: Desoxiadenosintrifosfato.

dCTP: Deoxicitosintrifosfato.

dGTP: Desoxiguanosintrifosfato

DNA: *Deoxyribonucleic acid*. Ácido desoxirribonucleico.

dNTP: Desoxitiamintrifosfato.

ECAs: Ensayos clínicos.

EPO: Eritropoyetina.

EPOR: Receptor de EPO.

EPOu: Eritropoyetina urinaria.

EPOh: Eritropoyetina humana plasmática.

ESAs: Estimulantes de la eritropoyesis.

Fe²⁺: Hierro.

FIH-1: Factor inhibidor del HIF-1.

FOXO TF: *Forkhead transcription factor*.

G: Guanina.

GATA-1: Activador de cascadas antiapoptóticas.

G-CSF: *Granulocytes colony stimulant factor*. Factor estimulante de colonias de granulocitos.

GH: *Growth Hormone*. Hormona de crecimiento.

GM-CSF: *Granulocyte stimulant factor-granulocyte macrophage*. Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

Hb: Hemoglobina.

HIF-1: *Hipoxia induced factor*. Factor inducido por hipoxia -1.

HNF-4 α : *Hepatocyte nuclear factor 4 α* . Factor nuclear del hepatocito nuclear 4 α .

HPLC: Cromatografía de alta resolución.

HRP: *Horseradish peroxidase*.

i.d. Intradérmica.

IEF: Isoelectroenfoque.

IGF: *Insulin growth factor*. Factor de crecimiento de la insulina.

I κ B: *Inhibitor of NF- κ B*. Inhibidor de NF- κ B.

i.m. Intramuscular.

i.v. Intravenoso.

JAK2: Janus tirosina quinasa 2.

JJOO: Juegos Olímpicos.

KCl: Cloruro potásico.

KDa: Kilodaltons.

LH: *Luteinizing hormone*. Hormona luteinizante.

MAIIA: *Membrane assisted isoform immunoassay*.

Mg²⁺: Magnesio.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

NESP: *Novel erythropoiesis stimulating protein. Darbopoetin alfa.*

NF-κB: *Nuclear factor Kappa light chain enhancer of activated B cells.*

Ng: Nanogramos.

O₂: Oxígeno.

PCR: *Polymerase chain reaction.* Reacción en cadena de la polimerasa.

PHD: Prolil-hidroxilasa.

pI: Punto isoeléctrico.

PI3 K: Fosfatidil inositol 3 quinasa.

PKB, Akt: Proteína quinasa B.

Pro: Prolina.

PVDF: *Polyvinil difluoride.*

RBCs: *Red Blood Cells.* Glóbulos rojos.

rDNA: *Recombinant DNA.* DNA recombinante.

RFLP: *Restriction fragment length polymorphisms*

rhEPO: *Recombinant human erythropoietin.* Eritropoyetina recombinante humana.

RNA: *Ribonucleic Acid.* Ácido ribonucleico.

RNA_m: Ácido ribonucleic mensajero.

s.c. Subcutánea.

SCF: *Stem cell factor.* Factor de células madre.

SDS: Dodecilsulfato.

SDS-PAGE: *Polyacrilamide gel electrophoresis.* Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Ser: Serina.

SNPs: *Single nucleotide polymorphisms.*

SOCS-3: Supresor de la señalización por citoquinas 3.

Taq polimerasa: *Termus aquaticus polimerasa.*

UCI: Unión Ciclista Internacional.

USA: *United States of America.* Estados Unidos.

VEGF: *Vascular endothelial growth factor.* Factor de crecimiento endothelial vascular.

VHL: *Von- Hippel Lindau.*

WADA: *World Anti-doping Agency.* Agencia Mundial Anti-dopaje.

WHO: *World Health Organization.* Organización Mundial de la salud.

XIAP: *X-linked inhibitor of apoptosis.*

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	<u>Página</u>
1. Introducción	1
2. Dopaje con EPO.	9
Fig 1: Amplificación exponencial por PCR.	10
Fig 2: Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	11
Fig 3: Proceso completo de la PCR.	13
Fig 4: Proceso de obtención de proteínas recombinantes.	14
Fig 5: Extremos cohesivos y acción de las enzimas nucleasa. y ligasa en la obtención de proteínas recombinantes.	15
Fig 6: Estructura de un plásmido.	16
Fig 7: Proceso de selección de bacterias con rDNA.	17
Fig 8: Esquema de los métodos de transferencia génica existentes: in vivo, ex vivo.	21
Tabla 1: Vectores no virales más conocidos empleados en el dopaje genético.	22
Tabla 2: Vectores virales más comunes utilizados en el dopaje genético.	23
3. Estructura de la EPO.	24
Fig 9: Estructura molecular de la eritropoyetina.	24
Fig 10: Estructura en línea de la eritropoyetina.	25

4. Biosíntesis de la EPO.	27
Fig 11: Esquema de biosíntesis de la EPO.	28
Fig 12: Localización del gen de la EPO en el cromosoma 7	29
5. Acciones biológicas: Eritropoyesis y mecanismos de acción (señalización).	30
Fig 13: Proceso de formación de glóbulos rojos (eritropoyesis).	31
Fig 14: Diagrama del feedback de la regulación de la eritropoyesis.	32
Fig 15: Esquema del mecanismo de señalización de la EPO.	35
6. Factores que modulan la producción de EPO: Factor inducible por hipoxia (HIF).	36
Fig 16: Relación entre saturación arterial de O ₂ y niveles de EPO en sangre.	37
Fig 17: Esquema de la estructura general de los HIFs.	37
Fig 18: Esquema de hidroxilación de Pro y Asn y modulación de la producción de EPO.	39
7. Derivados de la EPO: Agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESAs) que se unen a su receptor (EPOR).	40
Fig 19: Estructura de la epoetina α .	41
Fig 20: Estructura molecular de rhuEPO y darbopoetina α .	44
Tabla 3: Comparación estructural de rhuEPO y darbopoeitna α (NESP).	45

Tabla 4: Vida media en sangre de las distintas ESAs	46
Fig 21: Estructura química CERA.	46
Tabla 5: Origen y método de detección de las diferentes ESAs.	48
8. Indicaciones clínica EPO.	49
Fig 22: Gráfico de indicaciones clínicas de la eritropoyetina.	49
9. Efectos adversos.	52
Fig 23: Efectos potenciales de la señalización EPO-EPOR en tumores.	53
Fig 24: Algunos efectos beneficiosos y perjudiciales de la administración de EPO.	54
10. Métodos de detección de dopaje.	56
Fig 25: Esquema de variación de la carga neta de los aminoácidos en función del medio.	59
Fig 26: Esquema de electroforesis en gel de poliacrilamida.	60
Fig 27: Electroforesis en gel de agarosa.	61
Fig 28: Esquema de método de inmunotransferencia.	61
Fig 29: Esquema de detección y quimioluminiscencia	63
Fig 30: Migración electroforética de las isoformas de EPO en muestras de orina (en función de su pI y del pH del medio) mediante la técnica de isoelectroenfoque.	64
Fig 31: Esquema del método MAIA.	67
Fig 32: Ejemplo de un ABP.	68

Fig 33: Diagnóstico molecular.	70
11.Material y métodos.	72
Tabla 6: Criterios de inclusión y exclusión de las referencias bibliográficas utilizadas a lo largo del TFG.	75

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción a la eritropoyetina (EPO)

La eritropoyetina, comúnmente denominada EPO, es una glicoproteína ácida compuesta por 165 aminoácidos (aas) y que se sintetiza mayoritariamente en los riñones (por las células peritubulares de la corteza y la médula externa) y, en menor proporción, es producida por los macrófagos (que se encuentran situados en la médula ósea), el bazo, los ganglios submaxilares y las células de Kupfer hepáticas.

La principal función de esta proteína es la de estimular la eritropoyesis; es decir, se encarga de inducir la producción de células sanguíneas (eritrocitos) y, por lo tanto, de aumentar el transporte de oxígeno a través del torrente sanguíneo a todo el organismo.

Las alteraciones en la producción de esta hormona tienen distintas consecuencias a nivel clínico. La más importante es la anemia (la cual es ocasionada por un déficit de EPO) con su consecuente falta de eritrocitos e hipoxia tisular. Dado que existen patologías, como pueden ser los procesos cancerígenos, infecciones y enfermedades inflamatorias intestinales, que cursan con anemia, la EPO se emplea como terapia complementaria al tratamiento propio de este tipo de enfermedades. No sólo se pueden presentar enfermedades debido a un déficit de esta proteína, sino que también puede haber superproducción de la misma, y en este caso este aspecto se relaciona con la presencia de tumores en pacientes policitémicos y de quistes renales en algunas hepatopatías crónicas (pielosis hepática).

A pesar de su implicación clínica, en la actualidad esta proteína se está utilizando de forma abusiva e ilegal en el dopaje de deportistas de élite. Cada vez son más frecuentes los casos de atletas que han sido tratados o inyectados con este tipo de sustancia con el objetivo de mejorar su rendimiento y obtener mejores resultados en sus competiciones. Esto marca una gran diferencia entre el deporte justo y la utilización de agentes externos para alcanzar un mayor hito en lo que a deporte se refiere (1,2).

1.2. Dopaje: Definición e historia

1.2.1. Definición de dopaje

El dopaje consiste en la ingesta de distintas sustancias o sometimiento de los deportistas a distintos procesos o técnicas con el objetivo de mejorar las capacidades físicas de éstos. Se trata de un fenómeno que ha estado presente durante muchísimos años y que en la actualidad es uno de los grandes problemas a resolver en el deporte (3, 4).

La Agencia Mundial Anti-Dopaje (*World Anti-doping Agency*, WADA), define el dopaje en sangre como “el uso de ciertas técnicas y/o sustancias ilegales, que tienen como principal objetivo aumentar la cantidad de glóbulos rojos en sangre; aumentando de esta manera el transporte de oxígeno (O₂) a los músculos, con la consiguiente mejora en la resistencia de los deportistas que son sometidos al tratamiento”. Sobre todo se emplea en atletas de carreras de alta resistencia y en ciclistas (5).

1.2.2. Historia del dopaje

Ya desde la antigüedad, el dopaje ha estado presente en el mundo del deporte (mediante ingesta de distintos tipos de dietas, sustancias o incluso órganos), teniendo la finalidad primordial de mejorar las capacidades físicas de los atletas.

En los Juegos Olímpicos (JJOO) de la Antigüedad, se consideraba “sustancia dopante” a la dieta; una alimentación basada en queso o en carne podía marcar una gran diferencia entre la medalla de oro o de plata en la competición. Un claro ejemplo es el gran atleta de esa época Dromeos, cuya dieta se basaba únicamente en carne.

En las edades Antigua y Media también existen datos que reflejan la existencia de “dopaje”; que en estas épocas se realizaba mediante la ingesta de diversas sustancias que mejoraban el desarrollo de distintas actividades. Productos como el brandy, el vino e incluso las setas alucinógenas, se utilizaban de diferente

manera por las distintas civilizaciones; mientras los griegos los usaban como estimulantes, en el caso de los romanos se utilizaban para combatir las enfermedades y la fatiga.

En la primera mitad del siglo XIX, se realizaron grandes avances en lo que a la Medicina respecta, aunque en el ámbito del dopaje no hubo un gran desarrollo (3).

Fue en el último tercio de este siglo, cuando empezó a ser más familiar el uso de estimulantes para favorecer el rendimiento deportivo. Lo curioso es que en este periodo no hubo intención alguna de encubrir los casos de dopaje, los cuales no eran muy frecuentes en la época, sólo existe referencia de algún caso aislado en el cual el entrenador administraba alguna de estas sustancias a sus pupilos de manera privada (6).

Uno de los eventos clave, en lo que a dopaje se refiere, lo constituyen las carreras de ciclismo de 6 días que comenzaron en 1879. No se trataba de una pequeña vuelta de seis días como las que existen en la actualidad (que se dividen en seis etapas, de aproximadamente 6 horas), sino que en éstas no existía ningún tipo de descanso, pudiendo pasar el ciclista hasta 144 horas montado en la bicicleta, ya que el vencedor era aquel que realizaba más kilómetros en la bici.

Dado que este ritmo es imposible de aguantar por cualquier ser humano de manera natural, se recurría a la ingesta de sustancias ilegales con el objetivo de lograr más aguante. Los ciclistas solían tomar café mezclado con cafeína, estricnina (que en pequeñas dosis produce un efecto estimulante, aunque debían tener cuidado ya que en dosis elevadas podía producir un envenenamiento al deportista) o incluso cocaína.

Mientras tanto, los entrenadores, que eran los que se encargaban de controlar a sus deportistas, seguían investigando y probando otras sustancias distintas con las que poder mejorar aún más el rendimiento de los atletas.

A pesar de este gran avance en lo que a dopaje se refiere, el gran “boom” llega en el siglo XX con la implantación de los JJOO de la Era Moderna del deporte.

El primer caso data del año 1904. Fue el ganador de la medalla de oro en la especialidad de maratón de las Olimpiadas de Saint Louis, Thomas Hicks, al cual se le detectó consumo de brandy y estricnina, sustancias que utilizó para aumentar su capacidad de resistencia.

Pero este sólo fue el principio de un sinfín de casos resueltos o sin resolver. En las olimpiadas de Melbourne (1956), cabe destacar la victoria de las nadadoras japonesas, que eran capaces de aguantar la respiración debajo del agua durante más tiempo del habitual, o las sospechosas victorias de algunos ciclistas en las distintas competiciones.

En las olimpiadas de 1960 hubo un parón, en lo que al dopaje se refiere, debido a la gran superioridad de la Unión Soviética, que dominó el medallero gracias a la fuerte y robusta constitución de sus atletas. A pesar de que no se conocen casos de dopaje en esas Olimpiadas, este hecho provocó una oleada de investigaciones.

Sin embargo, en las olimpiadas de 1968, se llega a una situación insostenible; ya que aquí ya no se debate sobre la moralidad del dopaje, sino sobre cuál era el método más efectivo para lograr un mayor rendimiento y por lo tanto un aumento en el número de medallas.

Es a finales de ésta década cuando aumenta el uso de esteroides como agentes dopantes. Y es también en este periodo en el cual se introduce el dopaje sanguíneo (mediante transfusiones sanguíneas y administración de EPO), con objeto de inducir un aumento en el aporte de oxígeno. Este dopaje comenzó a ser utilizado sobre todo por los atletas de carreras de fondo (10.000 metros o maratones), los ciclistas y los esquiadores de fondo.

En las olimpiadas de la década de los 60, diversos estudios demostraron que más del 20% de los atletas participantes habrían consumido sustancias dopantes para obtener mejores resultados. Como si no fuera suficientemente alarmante esta estadística, estudios posteriores realizados en la década de los 90 detectaron un aumento exagerado de dopaje; no sólo en los deportes en los que habitualmente solían detectarse casos, sino que también comenzó a estilarse en otro tipo de disciplinas como el voleibol, hockey, balonmano... (3).

El caso más importante de dopaje en nuestro país se dio en el año 2006. La policía española arrestó a cinco sospechosos y detectó una gran variedad de sustancias dopantes prohibidas y suplementos energéticos en la sangre de varios deportistas de un centro deportivo de Madrid. En este centro, los ciclistas profesionales recibían bajo prescripción médica hormonas y sustancias dopantes. Se detectaron al menos 50 casos de dopaje.

Este informe fue inmediatamente enviado a la UCI (Unión Ciclista Internacional), que descalificó a 23 ciclistas profesionales, todos ellos participantes del Tour de Francia 2006. Lo más increíble de este caso fue que el ganador de este Tour, Floyd Landis, fue “cazado” tras doparse con esteroides, hecho que motivó su descalificación de la competición y la de su equipo también (7).

Tras una investigación sobre el uso de drogas en los deportes Olímpicos, Bamberger y Yaeger concluyeron que existen tres tipos distintos de atletas de élite (8):

- El primer tipo lo conformaban un pequeño grupo de atletas que no consumían sustancias ilegales para mejorar de su condición física y que dependían de su anatomía y fisiología, sin ningún tipo de alteración.
- El segundo tipo era el grupo más numeroso y lo componían todos aquellos atletas que tomaban productos dopantes e intentaban eludir o engañar los controles antidopaje realizados por la competición. Para ello se administraban las sustancias dopantes a bajos niveles, para que no fueran detectadas, o junto a otras sustancias que enmascaraban a las dopantes.
- El tercer tipo lo formaba otro grupo minoritario, que consumía esas sustancias ilegales pero que no era capaz de engañar al comité ni a los controles antidopaje.

Actualmente existen numerosas sustancias y técnicas de dopaje. En nuestro caso concreto, al centrarse el trabajo bibliográfico en la EPO, expondremos las dos estrategias de dopaje que se conocen con esta proteína (5).

1.3. Sustancias y métodos prohibidos en el deporte

Teniendo en cuenta la cantidad de casos de dopaje detectados en el deporte, la WADA ha creado una lista con los métodos y sustancias prohibidos en la competición deportiva, que ha sido actualizada en septiembre de 2012 y es válida para todo este año deportivo en el que entramos.

Se trata de una extensa lista con numerosos productos y métodos, los cuales se citan a continuación.

SUSTANCIAS PROHIBIDAS.

1. Sustancias no aprobadas: Cualquier sustancia ilegal que no se encuentra encuadrada en ninguna de las distintas secciones por distintas causas.
2. Agentes anabólicos: Entre los cuales se encuentran.
 - a. Esteroides anabólicos androgénicos (*Anabolic Androgenic Steroids, AAS*).
 - i. Endógenos.
 - ii. Exógenos.
 - b. Hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sustancias relacionadas.
 - i. **Estimulantes de la eritropoyesis (nos centraremos en estas).**
Entre las cuales se encuentran la EPO, darbopoetina, factores inducidos por la hipoxia (*Hypoxia induced factors, HIF*), receptor activador continuo de la eritropoyetina (*Continuous Erythropoietin Receptor Activator, CERA*) y peginesatide (hematide).
 - ii. Gonadotropina coriónica (*Chorionic gonadotropin, CG*) y hormona luteinizante (*Luteinizing Hormone, LH*).
 - iii. Corticotropinas.
 - iv. Factores de crecimiento (*Growth hormone, GH, Insulin growth factor, IGF*).
 - c. Beta – 2- agonistas.
 - d. Hormonas y moduladores metabólicos: Hay varios.
 - i. Inhibidores de la aromatasa.
 - ii. Moduladores selectivos del receptor del estrógeno.

- iii. Otras sustancias anti-estrogénicas.
- iv. Agentes modificantes de la función de la miostatina.
- v. Moduladores metabólicos.
- vi. Diuréticos y otros agentes enmascarantes.

También se encuentran prohibidas en la competición las distintas sustancias:

- 1. Estimulantes.
- 2. Narcóticos.
- 3. Cannabinoides.
- 4. Glucocorticoesteroides.

MÉTODOS PROHIBIDOS:

- a) Manipulación de la sangre y sus componentes.
- b) Manipulación física y química.
- c) Dopaje genético.

En este trabajo se abordará uno de los métodos más actuales y efectivos en lo que a deporte se refiere, “el dopaje genético”. Consiste en la introducción de una serie de genes o fragmentos de material genético para de esta manera modificar las condiciones fisiológicas de aquellos que son sometidos al proceso. Se indicarán los distintos métodos que existen en la aplicación de este tipo de dopaje. Asimismo se indicarán distintas proteínas recombinantes que se utilizan actualmente en el ámbito deportivo, centrándonos de todas ellas en la EPO.

También se detallará cuales pueden ser sus efectos adversos o beneficiosos en el mundo de la investigación y para qué tipo de enfermedades se encuentra indicada la administración de esta proteína.

Por último se especificará en el trabajo cual es la repercusión del dopaje en el ámbito deportivo, como existe la posibilidad de enmascarar los resultados en los controles antidoping.

Con este trabajo se trata de sumergir al lector en el mundo del dopaje, centrándonos en la transferencia de genes en el uso de las proteínas recombinantes, exponiendo el ejemplo de la EPO, cuyo mecanismo de señalización es aplicable a las demás proteínas en los distintos ámbitos en los que se usa.

Todos los fisioterapeutas han de conocer las distintas estrategias y aplicarlos en distintos mecanismos moleculares de estos compuestos, para así comprender sus propiedades tanto en el ámbito deportivo como en la clínica. Además son conocimientos que a la hora de trabajar en un equipo multidisciplinario son también muy útiles y que pueden hacer que el trabajo del equipo sea lo más correcto posible.

2. DOPAJE CON EPO

En la actualidad se conocen dos métodos de dopaje con la proteína EPO: el dopaje por medio de proteínas recombinantes y el dopaje genético mediante vectores (también denominado transferencia génica).

2.1. Proteínas recombinantes

Se trata de una técnica empleada por los deportistas para conseguir un aumento en el rendimiento de su práctica deportiva.

La síntesis de las proteínas recombinantes no se realiza en el organismo productor de las mismas. Estas son creadas gracias a la biotecnología mediante los procesos de separación, análisis y modificación de determinadas secuencias de ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*, DNA) (9, 10).

La tecnología del DNA recombinante (*Recombinant DNA*, DNAr) tiene un gran papel en la biotecnología y en el dopaje ya que, gracias a la manipulación de genes o secuencias genéticas, es capaz de producir grandes cantidades de proteínas que de manera natural se encuentran en concentraciones bastante más bajas en el organismo.

Para la creación de proteínas recombinantes se necesita: i) un organismo hospedador, que suelen ser bacterias o levaduras y se encargan de facilitar la producción del proceso, ii) un vector y iii) un fragmento de DNA con los elementos génicos necesarios para realizar la transcripción y la traducción en el organismo hospedador.

Las proteínas recombinantes tienen una aplicación muy amplia. Se utilizan para la producción de hormonas, estimuladores de crecimiento (como la hormona de crecimiento bovina, *Bovine Growth Hormone*, bGH) y enzimas, entre otros. Se aplican en la prevención de ciertas enfermedades, en menor medida en el ámbito de la nutrición y, obviamente y cada vez de manera más abusiva, en el mundo del deporte (10).

Su obtención comienza con la amplificación de un fragmento de DNA complementario inicial (*Complementary DNA*, cDNA), mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR).

PCR:

La PCR es una técnica empleada para amplificar secuencias específicas de DNA. Se trata de una forma sencilla y rápida de generar DNA de muestras biológicas, obteniéndose de esta manera miles de copias de esa secuencia seleccionada.

Fue desarrollada por Kary Mullis, basándose en la replicación del DNA de los organismos eucariotas mediante la DNA polimerasa. “La parte a destacar de este proceso es que permite la extracción de pequeños fragmentos, para luego ser amplificados; es decir permite el aislamiento de pequeñas secuencias de DNA de una larga cadena de DNA”. Esta enzima se encarga de realizar la síntesis de una cadena de cDNA en el sentido 5´-3´ utilizando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena.

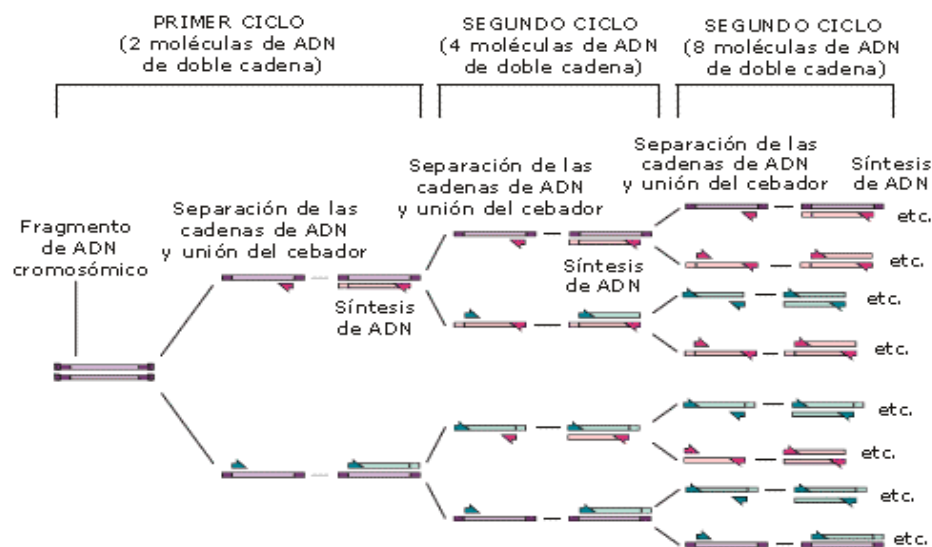


Figura 1: Amplificación exponencial por PCR.

Extraída de <http://biologiandrea.blogspot.com.es/2012/03/genetica.html>

Para crear la doble cadena se necesitan los cebadores o *primers*. Se trata de una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada extremo 3' del fragmento de DNA que queremos amplificar.

La PCR es un proceso que se encuentra dividido en tres etapas:

1. **Desnaturalización** del DNA de doble cadena: Se separa la hélice de DNA en dos hebras, y para ello ha de incubarse la muestra de material genético a altas temperaturas (entre 93 y 97°C).
2. **Hibridación** de los cebadores a la zona 3' específica de cada hebra. Para la realización de esta fase se reduce la temperatura (50-65°C).
3. **Extensión o elongación** del cebador mediante la acción de la DNA polimerasa. En esta fase se sintetiza una cadena sencilla en dirección 5'-3' mediante la enzima polimerasa, la cual va a incorporar desoxirribonucleótidos fosfato presentes en el medio, tomando como modelo la cadena molde. Para ello, se aumenta la temperatura (72°C).

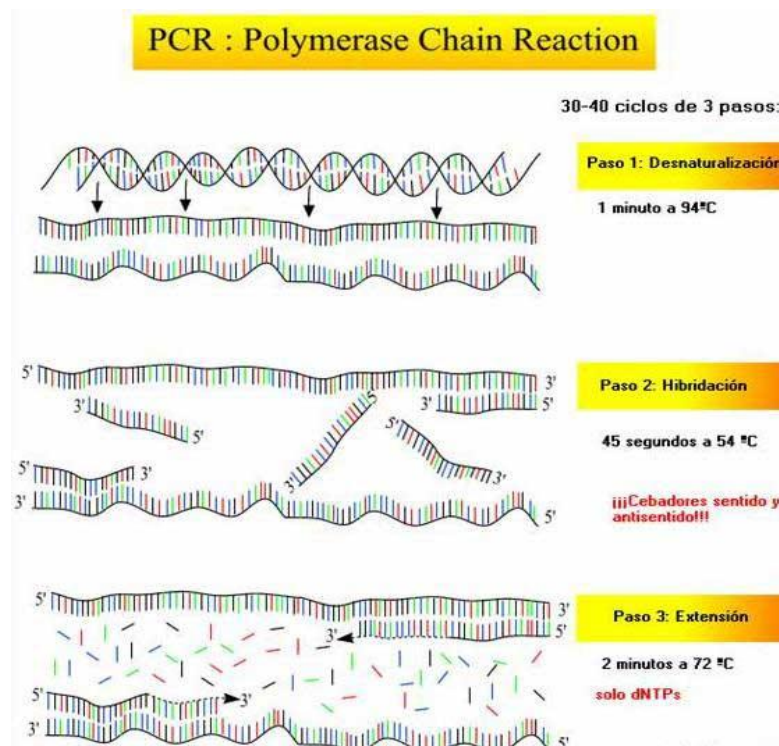


Figura 2: Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Extraída de <http://biologiandrea.blogspot.com.es/2012/03/genetica.html>

Para que se llevar a cabo la PCR, necesitamos:

- **Termociclador:** Es el aparato que se encarga de realizar los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de manera exacta.
- **Muestra de DNA:** Éste debe estar íntegro y no dividido en pequeños fragmentos inferiores a la muestra que se desea amplificar. No debe contener agentes quelantes, ni factores sanguíneos, ni fenol (los cuales inhiben la acción de la polimerasa) y su contenido en muestra ha de estar entre los 100 y los 500 nanogramos (ng).
- **Cebadores (*primers*):** Deben de tener un contenido equitativo de citosina (C) y guanina (G). Su temperatura de hibridación oscila entre 45 y 65°C, y se ha de evitar la complementariedad entre esta pareja de cebadores.
- **DNA polimerasas:** Se encargan de catalizar la reacción y se clasifican en dos subgrupos:
 - *Termolábiles:* Con una temperatura óptima de 37-42°C. Se desnaturalizan con el calor.
 - *Termoestables:* La temperatura óptima es de 74°C y llega a resistir entre 40-50 minutos a 96°C de temperatura.

Actualmente se usa la Taq polimerasa (*Termus Aquaticus polimerasa*), ya que llega a soportar altas temperaturas.

- **Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs):** Son cuatro, desoxiadenosíntrifosfato (dATP), desoxiguanosíntrifosfato (dGTP), desoxicitosíntrifosfato (dCTP) y desoxitiamíntrifosfato (dTTP). Se añaden a la solución y se unen a magnesio (Mg⁺⁺).
- **Tampón de la reacción:** Su función es la de mantener el pH adecuado para que actúe la DNA polimerasa.
- **Sales:** Son dos principalmente:
 - *Cloruro potásico (KCl):* Influye en la desnaturalización del ADN, cuando se halla en altas concentraciones desnaturaliza las secuencias cortas

de DNA, mientras que si se encuentra en concentraciones bajas desnaturaliza las secuencias largas del DNA.

- *Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$):* Se encarga de aumentar la temperatura de la hibridación del DNA; la concentración de este ión es básica para la optimización de la reacción. En el caso de que haya altas concentraciones de este compuesto disminuye la especificidad de la PCR y si está en baja concentración ocurre lo contrario.

El número de ciclos depende de la cantidad de DNA que hay en la muestra, una vez que han sido optimizados los demás factores y fragmentos. Es muy importante que no sean muchos, para que de esta manera no haya una amplificación de productos no deseados creados por hibridaciones no específicas (11, 12).

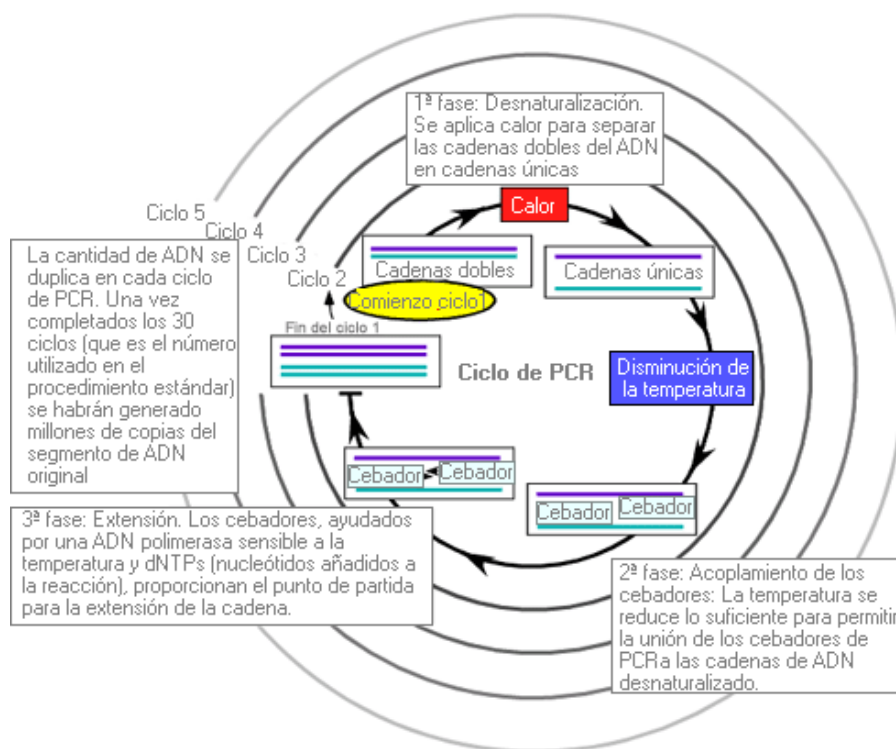


Figura 3: Proceso completo de la PCR

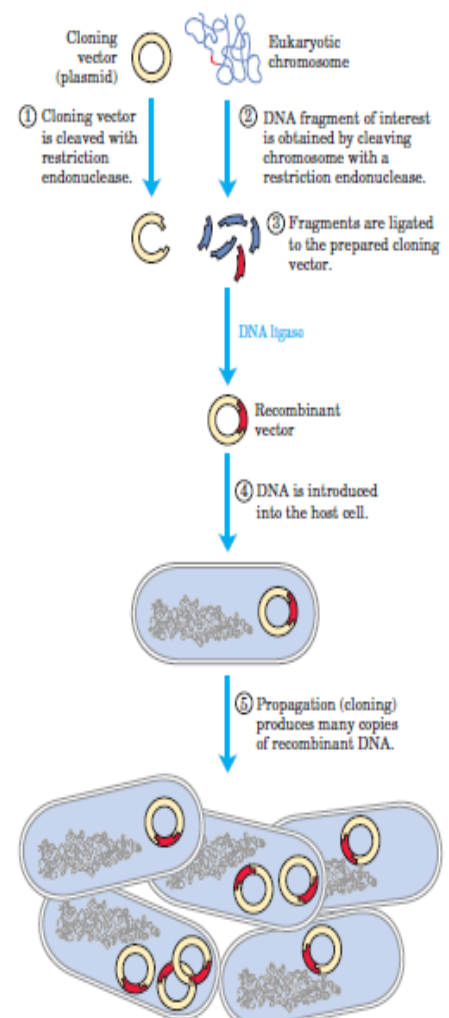
Extraída del buscador Google.

Hay que señalar que la PCR no forma parte del proceso de obtención de proteínas recombinantes, sino que es el paso anterior y necesario a la obtención de las mismas. Con este proceso lo que se busca es crear el máximo número de fragmentos de DNA para luego introducirlos en las células que se quieren modificar.

Proceso de obtención de proteínas recombinantes

Una vez amplificada la secuencia de DNA, se lleva a cabo el proceso de obtención de DNA recombinante (rDNA) que se desarrolla en 5 pasos:

- Cortar secuencias de DNA en los sitios precisos mediante la acción de las **endonucleasas de restricción**.
- Seleccionar una pequeña molécula de DNA que tenga la capacidad de ser replicada y cortarla con la misma enzima de restricción.
- Unir los dos fragmentos de DNA obtenidos por medio de la enzima DNA ligasa, para de esta manera originar el rDNA.
- Introducir el material genético creado en las células, mediante la transfección de las mismas.
- Seleccionar las células que presentan el material genético que ha sido modificado, mediante la presencia de un antibiótico.



**Figura 4: Proceso de obtención de proteínas recombinantes.
Extraída de la bibliografía 13**

Las endonucleasas de restricción son unas enzimas bacterianas que se encargan de reconocer y cortar en zonas específicas del material genético. Crean fragmentos de DNA cuyos extremos son complementarios a los del vector. Tanto el vector (que suele ser un plásmido) como el DNA se cortan con la misma enzima, por ejemplo la ECO R1.

Tras ser creada la secuencia de DNA que se desea clonar, ésta se unirá al vector seleccionado mediante la acción de otra enzima, la DNA ligasa, para crear una secuencia de material genético de doble hebra, que se consigue mediante la formación de enlaces fosfodiéster 5'-3'.

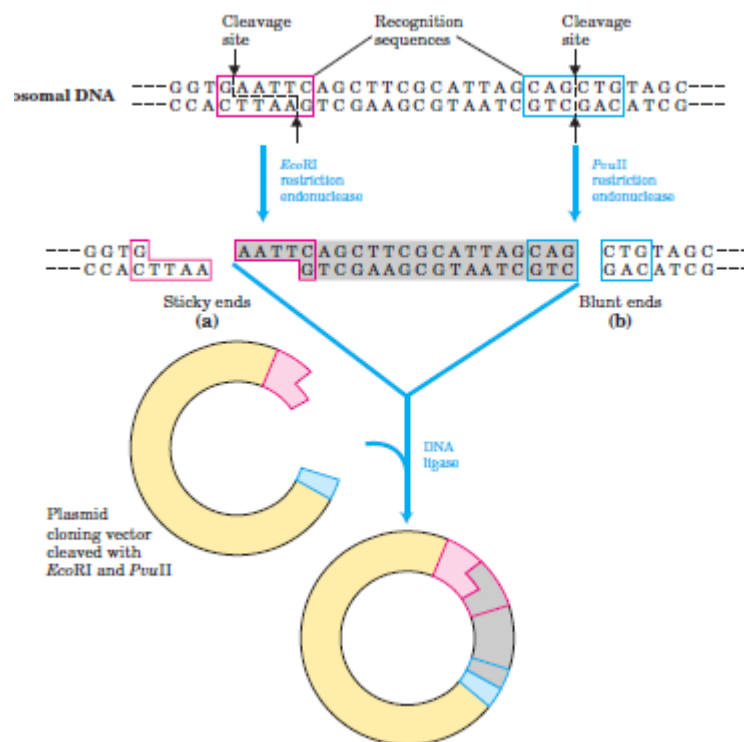


Figura 5: Extremos cohesivos y acción de las enzimas nucleasa y ligasa en la obtención de proteínas recombinantes

Extraída de la bibliografía 13.

La combinación de la secuencia del DNA, junto con el vector, da lugar al rDNA.

La secuencia de DNA seleccionada se inserta en los denominados vectores de clonación; entre ellos destacan los plásmidos, los bacteriófagos y los cromosomas bacteriales artificiales, siendo los primeros los más utilizados.

Los plásmidos son moléculas de DNA circular que se replican de manera independiente al cromosoma y que pueden introducirse en las células bacterianas mediante un proceso denominado transfección. Éste se basa en el uso de detergentes que forman minúsculos poros en su membrana, mediante los cuales se introduce el material genético.

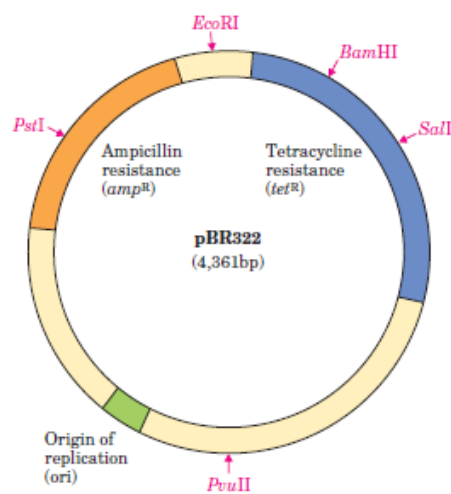


Figura 6: Estructura de un plásmido

Extraída de la bibliografía 13.

Para poder seleccionar las células transfectadas, dichos vectores cuentan con uno o varios genes de resistencia a antibióticos en su secuencia. Tras la incubación de las células con dicho antibiótico, solo sobrevivirán aquellas que han sido transfectadas (13).

Las proteínas recombinantes pueden ser expresadas, además de en cultivos celulares de bacterias, en levaduras, hongos, mamíferos, plantas e insectos. La recombinación de genes humanos en bacterias es una técnica de gran valor porque las bacterias se reproducen rápidamente y pueden duplicar su número cada 20 minutos. De esta forma se pueden obtener en poco tiempo muchas copias del gen

humano incluido en el DNA bacteriano y producir grandes cantidades de proteínas recombinantes.

A escala industrial, la producción de proteínas recombinantes involucra las siguientes etapas:

- **Fermentación:** las bacterias son cultivadas en tanques sellados (fermentadores) que contienen un medio de cultivo nutritivo.
- **Extracción:** las células son centrifugadas para recuperar las proteínas de su interior.
- **Purificación:** se separa la proteína recombinante de las otras proteínas bacterianas.
- **Formulación:** la proteína recombinante se modifica para conseguir una forma estable y estéril que puede administrarse terapéuticamente.

Cada una de las fases de la elaboración implica un manejo muy cuidadoso de los materiales y un estricto control de calidad para optimizar la extracción, la pureza, la actividad y la estabilidad del fármaco.

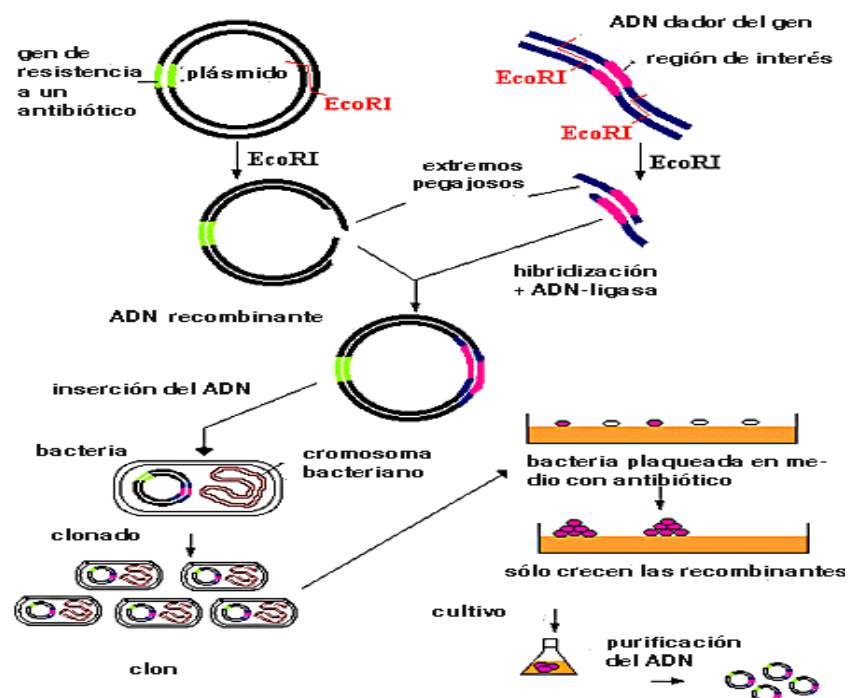


Figura 7: Proceso de selección de las bacterias con rDNA.

Extraída de www.quimicaviva.qb.fcen.ub.ar

La identificación, aislamiento y clonación del gen de la EPO humana impulsó la elaboración de proteínas recombinantes. Inicialmente se probó con *Escherichia coli*, pero se obtuvo una hormona carente de carbohidratos y sin actividad biológica *in vivo*. Posteriormente, el gen de la EPO humana se incorporó a células ováricas de hámster chino; el cultivo de éstas células *in vitro* produce en el medio de cultivo abundantes cantidades de la hormona, que posteriormente se purifica por cromatografía (11).

En la actualidad el abuso de éstas proteínas sigue en avance, siempre con el objetivo de lograr beneficios mayores, amenazando de esta manera la competitividad “limpia” que caracteriza el deporte y manchándolo cada día de nuevos y sorprendentes casos (10).

Su similitud con las proteínas endógenas y los grandes efectos que provocan en el organismo, hacen que su uso en el ámbito deportivo vaya en aumento según pasa el tiempo, haciendo menos justa la competición y dejando de premiar aquel que trabaja para conseguir su objetivo de manera natural (3).

Teniendo en cuenta que este trabajo se centra en la proteína específica de la EPO, un claro ejemplo de proteína recombinante sería el de la *recombinant human erythropoietin*, rhuEPO. La rhuEPO comenzó a utilizarse hace veinte años, sobre todo en los deportes aeróbicos (los de competiciones de fondo), con el objetivo de aumentar la resistencia del deportista. Se utilizó masivamente por su similitud estructural con la EPO producida de manera endógena, por su baja o casi mínima concentración en el organismo, porque no induce la formación de anticuerpos y por su corto periodo de vida, lo que dificultaba enormemente su detección en los controles antidopaje (5).

Han existido diversas generaciones de proteínas recombinantes. En la actualidad, las proteínas de última generación presentan un efecto más prolongado en el organismo (mayor vida media) y son más difíciles de detectar. De ahí la existencia de un número mayor de controles antidopaje en todo tipo de competiciones deportivas (dado que su uso no sólo se ciñe a un tipo específico de deporte) y más exhaustivos aún de lo que anteriormente eran.

2.2. Dopaje genético mediante vectores (transferencia génica):

Se define la terapia génica como “la transferencia de células, genes o fragmentos de material genético o agentes farmacológicos de manera artificial para de esta manera modular la expresión de los genes endógenos, y que el material transferido a las células dañadas sirva para tratar distintos tipos de enfermedades”. En la actualidad sobre todo se utiliza para tratar desórdenes genéticos, como la hemofilia A y B, la fibrosis quística o enfermedades isquémicas del corazón entre otras.

El dopaje genético es un método innovador que comenzó a ser utilizado en el siglo XX. Persigue que ciertos genes se expresen en mayor proporción que otros en los deportistas, para de esta manera aumentar el rendimiento atlético del deportista sometido al dopaje genético (14, 15).

Esta unión entre la terapia génica y el deporte es más que evidente aún si se tiene en cuenta que los primeros estudios en este ámbito fueron realizados con proteínas típicas de los casos de dopaje como son la EPO o la GH (15).

Por ello es necesario que se desarrollen técnicas moleculares específicas que sean capaces de detectar esas diferencias genéticas introducidas de manera artificial en el genoma del atleta, y así combatir contra la trama del dopaje (14).

Se pueden diferenciar dos métodos distintos de transferencia de genes, los cuales sustituyen a la administración de drogas eritropoyéticas; estos dos métodos son:

- **Método *ex vivo*:** Se trata del método en el cual los genes se transfieren a células en cultivo que han sido extraídas y aisladas del tejido, mantenidas en cultivo y sometidas al proceso de transfección *in vitro* con vectores apropiados. Una vez seleccionadas las células transfectadas, se expanden en cultivo y se incorporan nuevamente al organismo. Por este método las células autólogas y heterólogas son transferidas al individuo después de la transfección.

Las principales ventajas de este método son: la posibilidad de elegir el tipo de célula que se quiere tratar, el poder mantener un control durante el proceso y también la mayor efectividad de la transfección genética. Por su parte, también presenta una serie de inconvenientes, siendo los más importantes la complejidad, el excesivo coste de los protocolos y también la imposibilidad de transfectar los tejidos que no son capaces de crecer en cultivo; además también existe el riesgo, aunque este suele ser mínimo, de que pueda haber problemas de contaminación de las células que han sido manipuladas.

- **Método *in vivo*:** En este método los genes se transfieren mediante vectores directamente al sujeto de estudio, sin que haya extracción ni manipulación *in vitro*; existen tres formas de introducción: intravenosa (i.v), intramuscular (i.m) e intradérmica (i.d).

La principal ventaja de este método sobre la terapia génica *ex vivo* es su gran sencillez. A pesar de ello, también presenta algunos inconvenientes. El primero es que no hay un gran control del proceso de transferencia génica; el segundo es la menor eficiencia, dado que no se pueden amplificar las células que han sufrido la transfección; y el tercer y último inconveniente es la dificultad de obtener una alta especificidad tisular.

Una de las variantes de este método es la transferencia *in situ*, en la cual el tratamiento se realiza directamente sobre un tejido en particular. Para este método se suelen usar vectores virales recombinantes para transferir los genes a un alto nivel de expresión potencial (14, 16, 17).

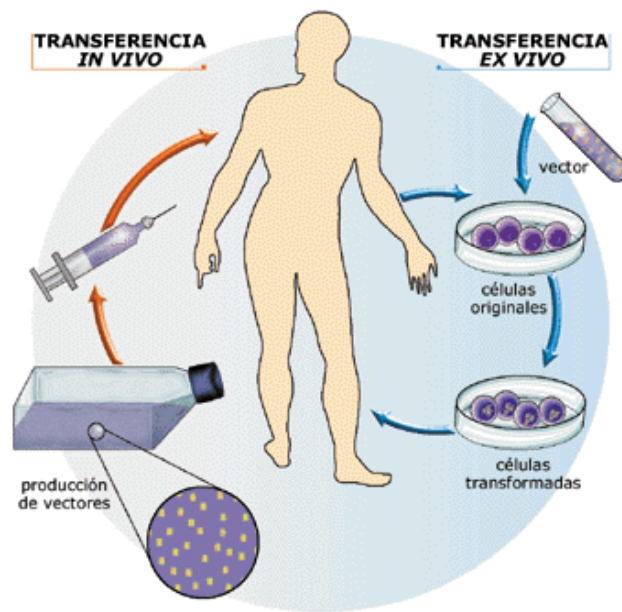


Figura 8: Esquema de los métodos de transferencia génica existentes: in vivo y ex vivo.

Extraída de www.iesfuentenueva.net

La transferencia génica requiere un buen desarrollo tecnológico y un amplio conocimiento de la genética. Es fundamental la elección del vector (de naturaleza viral o no viral) y un buen manejo de las técnicas de transferencia (12).

El material genético que normalmente se utiliza en la transferencia génica es el DNA, ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid, RNA) o células dañadas. El gen transferido debe llevar alguna secuencia promotora que permita su expresión y también ha de ir acompañado de un marcador para de esta manera identificar las células a las que se ha de incorporar la información genética. A continuación, se transfieren esas células con el gen incorporado al sujeto y se espera a que actúe en el organismo.

Posiblemente el paso más difícil en el proceso de la transferencia génica sea la elección del vector. Estos pueden ser de dos tipos: (14, 15).

- No virales.
- Virales.

Los vectores no virales más típicos son los liposomas y se caracterizan por su fácil producción, su baja toxicidad y poca inmunogenicidad. Aunque también presentan un gran inconveniente, y es que su eficiencia es bastante baja debido a su bajo índice de transfección génica, por lo que su utilización va disminuyendo cada vez más.

Por ello, como variante a los vectores no virales, aparecen los vectores virales. En este método de transfección génica todos los genes virales de proteínas patogénicas son eliminados y reemplazados por genes sanos. Pero no son todas ventajas, ya que los vectores virales en ocasiones pueden tener efectos secundarios que pueden afectar de manera muy grave al organismo o incluso ser letales si el proceso realizado no se desarrolla según lo esperado.

Se pueden observar los vectores no virales y virales más utilizados en las siguientes tablas (15):

<u>TIPO DE VECTORES</u>	<u>VECTORES</u>	<u>PROPIEDADES</u>
No virales	Liposoma	Baja eficiencia en suministro de genes.
	Pistola de genes de DNA.	Baja inmunogenicidad.
	Proteína complejo DNA. DNA desnudo.	Fácil de producir.

Tabla 1: Vectores no virales más conocidos empleados en el dopaje genético.

Extraída de la bibliografía 9.

<u>TIPO DE VECTORES</u>	<u>VECTORES</u>	<u>PROPIEDADES</u>
<u>Virales</u>		
	Adenovirus	Infecta una amplia gama de tejidos. Baja toxicidad e inmunogenicidad. Infecta solo en mitosis a las células activas. Baja capacidad de inserción de genes.
	Adenovirus asociados	Poseen un serotipo específico determinado. Baja toxicidad e inmunogenicidad. Persistencia alta del gen transferido. Baja capacidad para la inserción de genes.
	Virus Herpes o Herpes simple.	Virus grande incapaz de cruzar las barreras del tejido conectivo en el músculo. Actúa en células mitóticas y postmitóticas. Gran capacidad de inserción. Rechazo inmunológico común.
	Oncorretrovirus (retrovirus)	Requiere la división celular para su integración. Inmunogenicidad sólo infecciosa. Actúa en células activas mitóticas. Baja capacidad de inserción genética.
	Lentivirus	No requiere división celular.
	Virus semliki	Expresión genética con plazo de vida corto.

Tabla 2: Vectores virales más comunes utilizados en el dopaje genético.

Extraída de la bibliografía 9.

3. ESTRUCTURA DE LA EPO

La EPO es una glicoproteína, miembro de la familia de las citoquinas de tipo I. Posee una estructura globular compacta de cuatro hélices que se encuentran conectadas mediante una serie de bucles, tal y como se puede observar en la figura 9 (5, 18, 19).

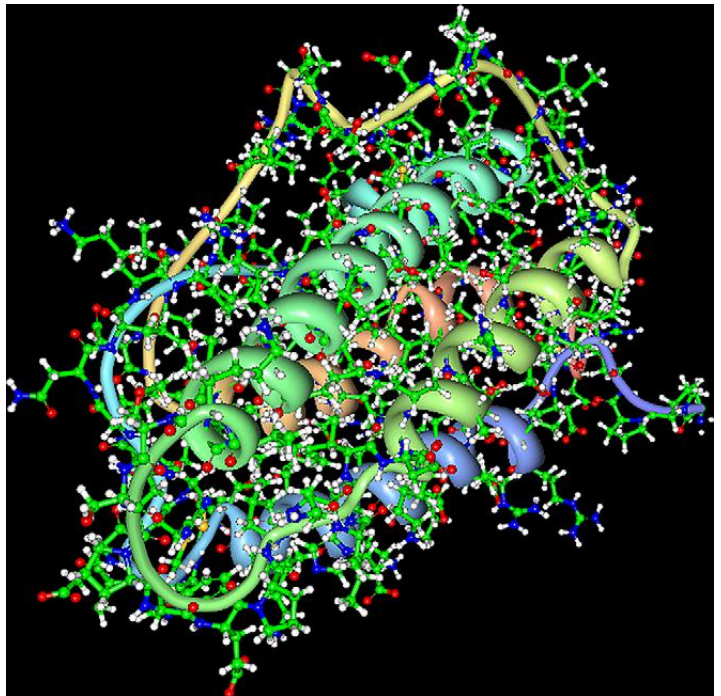


Figura 9: Estructura molecular de la eritropoyetina

Extraída de bibliografía 20

Esta glicoproteína se produce de manera mayoritaria en los riñones, en respuesta a la hipoxia. Debido a esto, se estimula el gen de la EPO aumentando el nivel de la hormona. Su función principal es la de estimular la formación de eritrocitos, estimulando la eritropoyesis (15, 17, 20).

La EPO es un péptido formado por 166 aas, aunque debido al procesamiento del precursor pierde una arginina (Arg) en el C terminal, quedando de esta manera una hormoglicoproteína de 165 aas (que es la que se describe habitualmente). Además esta proteína posee sitios específicos de unión para el receptor de la EPO (EPOR) (5, 17, 18, 19).

Existen dos puentes disulfuro intracatenarios, que se establecen entre los residuos de cisteína $\text{Cis}^7\text{-Cis}^{161}$ (primer par) y $\text{Cis}^{29}\text{-Cis}^{33}$ (segundo par) (5, 19).

La masa molecular de esta proteína es de 30,4 kilodaltons (KDa) aunque las modificaciones post-traduccionales que sufre hacen que existan diversas isoformas de la proteína. Por ello, su masa puede oscilar entre los 34 y los 38 KDa, tal y como se detecta en los geles de SDS- poliacrilamida. (18, 19).



El N-acetilneurámico, también conocido como ácido siálico, es decisivo para la actividad biológica “in vivo” de la EPO. El ácido siálico permite la unión de la EPO

a los receptores específicos de superficie de los precursores eritroides, estimulando su diferenciación y maduración clonal. La presencia del ácido siálico sobre los grupos carbohidrato retarda la depuración hepática de EPO y garantiza una estimulación más prolongada de los receptores eritroides.

Las cadenas de carbohidratos de la EPO son casi siempre las responsables de su integridad y estabilidad, siendo el punto principal del desarrollo de la nueva rhuEPO y de sus análogos hiperglicosilados, como la darbopoetina α , la cual posee una mayor vida media en plasma (19).

A parte del ácido siálico, los azúcares asociados por enlaces N-glucosídicos contienen residuos cargados negativamente (por ejemplo: derivados del sulfato), que hacen que las diferencias entre la EPO normal y la urinaria sean algo mayores (5).

Un hecho a destacar es la poca diferencia que existe entre la EPO humana y la rhuEPO (la proteína recombinante de última generación). Estas proteínas son idénticas en cuanto a sus estructuras primaria y secundaria; sin embargo, se detectan diferencias en la composición de los enlaces N-glucosídicos y O-glucosídicos entre la EPO urinaria/plasmática humana (EPOu, EPOh) y la rhuEPO. Las diferencias en la movilidad electroforética permite detectar a los laboratorios la rhuEPO en muestras urinarias, cuando los deportistas las usan con el objetivo de aumentar su rendimiento físico; el ejemplo más claro de este nuevo tipo de proteínas actuales es el de las epoetinas α y β (18).

4. BIOSÍNTESIS DE LA EPO

La eritropoyetina es una proteína que durante el desarrollo fetal se sintetiza de forma mayoritaria en el hígado, por los hepatocitos y las células intersticiales, y que empieza a formarse en los riñones en el último periodo del embarazo. Sin embargo, tras el nacimiento, el 80% de su producción tiene lugar en los riñones, a nivel de los túbulos proximales y en los fibroblastos peritubulares.

El determinante de la producción de EPO es la cantidad de oxígeno en sangre. Existen sensores renales que ante la disminución de O₂ aumentan la producción de EPO, entre los cuales pueden encontrarse las prostaglandinas, los andrógenos... (1).

Como se refleja en la figura número 11, inicialmente la eritropoyetina es sintetizada como un precursor formado por 193 aas. Aunque más tarde son eliminados de esta glicoproteína inicial un péptido señal, compuesto por 27 aas, en el extremo aminoterminal, y una Arg en el extremo carboxiterminal. Posteriormente, la proteína es glicosilada, de manera que se establecen 3 enlaces N-glicosídicos y un enlace O-glicosídico en ella.

Una vez realizados todos estos procesos se obtiene la proteína definitiva, estando el 40% de su masa molecular constituida por carbohidratos. Consta de 165 aas y adquiere una estructura globular formada por 4 α -hélices (20).

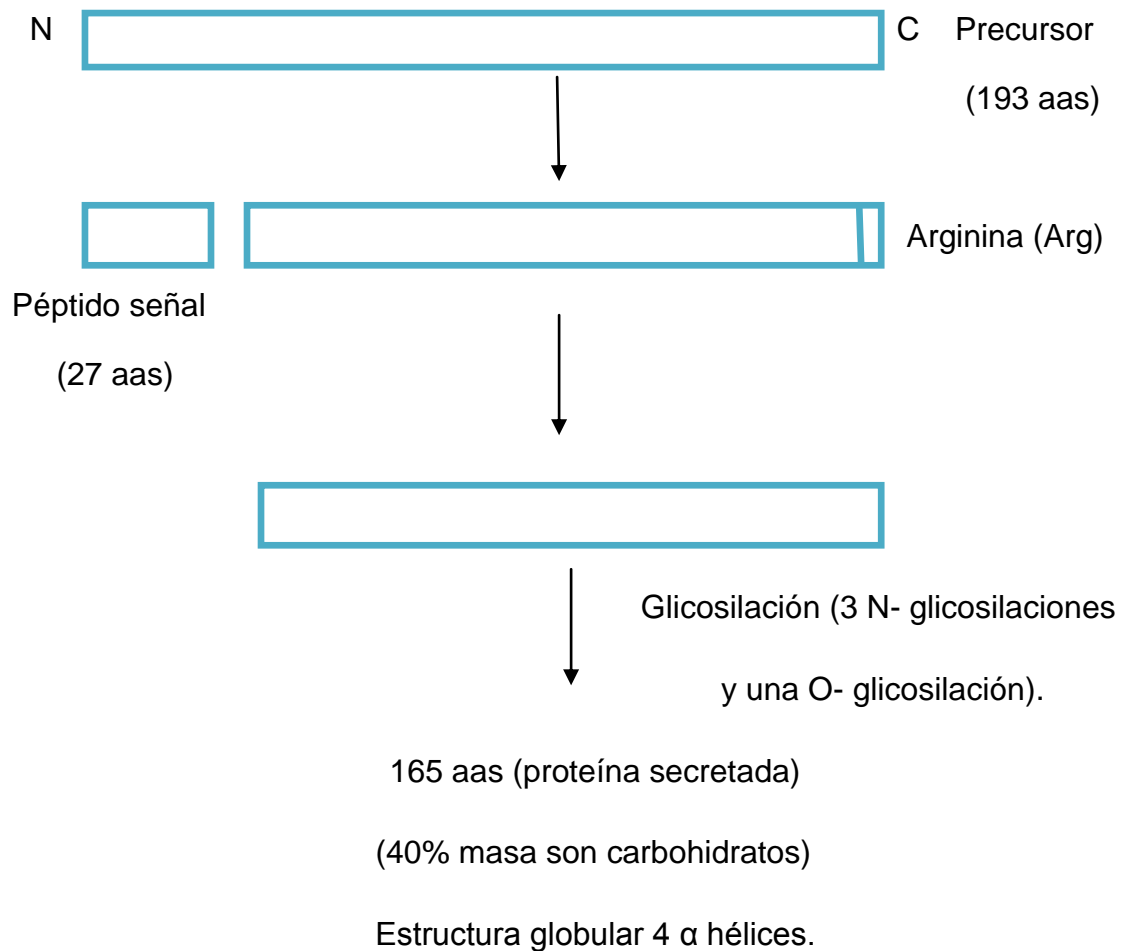


Figura 11: Esquema de biosíntesis de la EPO.

Esquema propio del alumno.

4.1. Gen de la eritropoyetina

El gen de la EPO humana está presente como una copia simple en el cromosoma 7, en la región q11-q22 del genoma. Existe una elevada homología entre el gen de la EPO del mono (90%) y del ratón (80%) con el gen humano.

El gen de la EPO presenta 5 exones y 4 intrones dando lugar a la pro-EPO, que está constituida por 193 aas. Tras los numerosos cambios conformacionales se generará finalmente la proteína EPO.

El gen se encuentra bajo el control de muchos factores de transcripción. GATA-2 y NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), son dos de los factores que actúan inhibiendo la expresión del gen que codifica para la eritropoyetina (17).

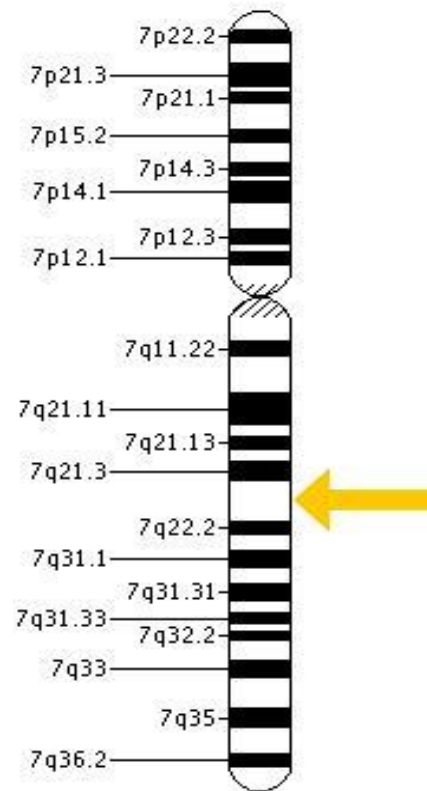


Figura 12: Localización del gen de la EPO en el cromosoma 7.

Extraído de <http://ghr.nlm.nih.gov> (Genetics Home Reference)

5. ACCIONES BIOLÓGICAS: ERITROPOYESIS Y MECANISMO DE ACCIÓN (SEÑALIZACIÓN)

5.1. Eritropoyesis

La eritropoyesis es un complejo proceso fisiológico, por el cual las células precursoras eritroides se dividen, proliferan y se diferencian, dando lugar a la formación de los eritrocitos o glóbulos rojos (*Red Blood Cells*, RBCs).

La eritropoyesis está regulada por varias citoquinas (Figura 13) incluyendo, el factor estimulante de colonias de granulocitos (*Granulocyte colony stimulant factor*, G-CSF), el factor de células madre (*Stem cell factor*, SCF), las interleuquinas (IL) 1, 3, 5, 9, 11, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte colony stimulant factor- granulocyte macrophage*, GM-CSF), el factor de crecimiento insulínico (*Insulin Growth Factor 1*, IGF-1) y la EPO. La EPO actúa en los estadios tardíos de desarrollo de los progenitores eritroides, principalmente sobre las unidades formadoras de colonias eritroides (*Colony forming unit-erythroid*, CFU-e).

En el proceso de la eritropoyesis, se parte de células hematopoyéticas que poseen receptores para distintas citoquinas y que se van a encargar de controlar junto a la EPO este proceso. Estas células progenitoras, que residen en la médula ósea de forma mayoritaria, se diferencian para dar lugar a las células CFU-e, en las cuales aparecen EPORs. Esta proteína solo actúa si se une a sus receptores.

En el proceso de diferenciación, las células eritroides adquieren la capacidad de sintetizar hemoglobina y progresivamente pierden los receptores de EPO. Las células CFU-E se diferencian en proeritroblastos y éstos definitivamente en los eritroblastos. Los eritroblastos se enuclean, es decir pierden el núcleo, para de esta forma dar lugar a los reticulocitos, denominados así por la asociación de la reticulina al RNA circulante. Pasados unos días, la concentración de reticulina va

disminuyendo, de manera que los reticulocitos se diferencian en los definitivos glóbulos rojos, que dejan de expresar EPOR.

La eritropoyesis se estimula por la EPO endógena EPOe y bajo condiciones de hipoxia, pudiendo aumentar la concentración de la EPOe hasta 1000 veces por encima de lo normal (21).

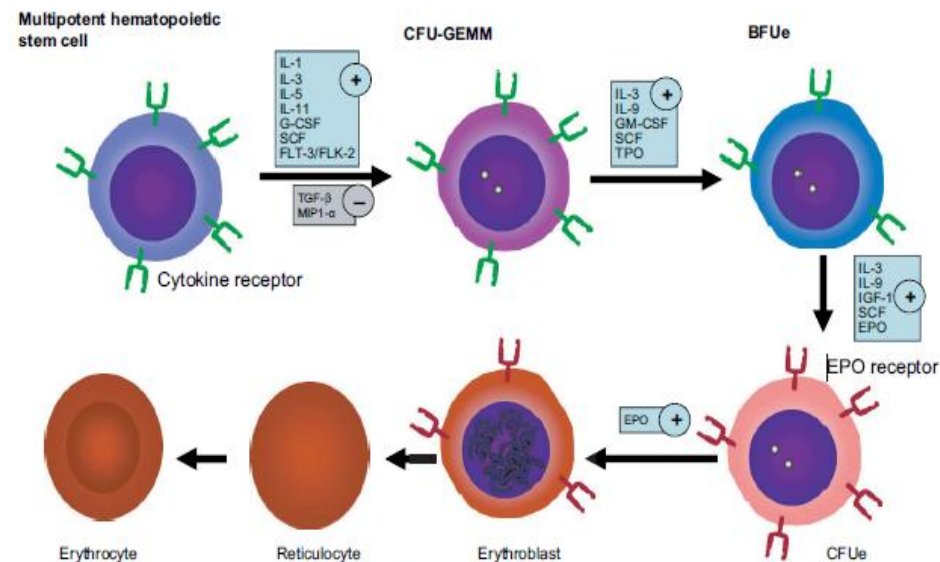


Figure 1. Erythropoiesis. BFUe = burst-forming unit-erythroid; CFUe = colony-forming unit-erythroid; Epo = erythropoietin; FLK = fetal liver kinase; FLT = fetal liver tyrosine kinase; G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor; GEMM = granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte; GM-CSF = granulocyte macrophage CSF; IL = interleukin; MIP = macrophage inflammatory protein; SCF = stem cell factor; TGF = transforming growth factor; TPO = thrombopoietin.

Figura 13: Proceso de formación de glóbulos rojos (eritropoyesis).

Extraído de bibliografía 20.

El principal mecanismo mediante el cual la EPO mantiene la eritropoyesis es la prevención de la muerte celular por apoptosis. Se produce una activación de las caspasas 3, 7 y 8 (proteínas mediadoras de la apoptosis), que a través de los factores de transcripción TAL-1 y GATA -1 (activador de cascadas antiapoptóticas) desencadenan la apoptosis, controlando la tasa de proliferación de los progenitores eritrocíticos (17, 18).

Los glóbulos rojos son las células más abundantes de la sangre, constituyendo más o menos el 99% de las células totales y representando un

volumen sanguíneo de entre el 40 y el 45%. Un ser humano sano, cuenta con un volumen sanguíneo de 5 litros, lo que supone $2,5 \times 10^{13}$ células.

Los eritrocitos cuentan con una vida media de entre 100-120 días aproximadamente. Las pérdidas diarias de eritrocitos son de entre un 0,8 y un 1% cada día, por lo que es básico el proceso de la eritropoyesis para compensar esa pequeña pérdida y que de esta manera no se produzca ninguna anomalía (20).

La función principal de las RBCs es la del transporte de O_2 desde los pulmones a los tejidos dependientes de oxígeno (cerebro, músculos...). Los cambios en las concentraciones de O_2 precisan de distintos tipos de adaptaciones fisiológicas, las cuales pueden ser tanto a corto plazo como a largo plazo. La adaptación a corto plazo consiste en el aumento de las frecuencias cardíaca y respiratoria, la vasoconstricción y los cambios en el volumen sanguíneo, para hacer frente al déficit de O_2 que hay en el cuerpo. La adaptación a largo plazo es la eritropoyesis y su principal objetivo es el de aumentar el transporte de oxígeno en sangre, aumentando las concentraciones de RBCs y hemoglobina (Hb) en sangre (20, 21, 22).

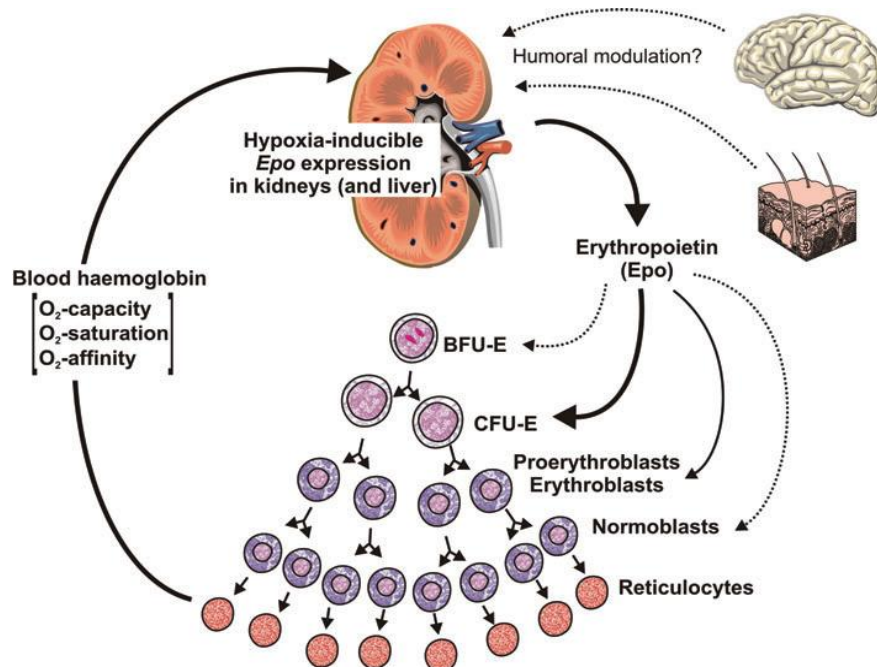


Figura 14: Diagrama del feedback de la regulación de la eritropoyesis.

Extraído de la bibliografía 22

5.2. Mecanismo de acción (Señalización)

La EPO interacciona en las células eritroides con un receptor de membrana, específico y saturable. Éste forma parte de una superfamilia de receptores para citoquinas. El EPOR es un polipéptido (66 a 78kDa) de 507 aminoácidos que posee 3 dominios: un dominio extracelular de unión a la EPO que tiene 223 aminoácidos, un dominio transmembrana de 24 aminoácidos y un dominio citoplasmático de 236 aminoácidos. Como otros miembros de la superfamilia de receptores para citoquinas, poseen 4 cisteínas y un motivo triptófano-serina-X-triptófano-serina (WSXWS), en el que X es un aminoácido cualquiera, en el dominio extracelular. El receptor de EPO posee además un quinto residuo de cisteína, del que carecen los otros miembros de la superfamilia. El dominio citoplasmático del receptor posee 2 regiones con funciones opuestas; una región próxima a la membrana de 103 aminoácidos, que transduce las señales proliferativas, y una región carboxi-terminal de 40 aminoácidos, que las inhibe o regula en descenso (23).

El receptor de la EPO se encuentra en la superficie de las células eritroides progenitoras. La unión de la EPO activa a EPOR induciendo su dimerización y el cambio conformacional necesario para la activación de esta vía (1, 18, 21). Dicha activación está mediada por la fosforilación de la proteína JAK2 (*Janus tirosina quinasa 2*), que se encuentra unida al receptor en el dominio de transmembrana. La JAK2 fosforila ocho residuos tirosina en el dominio citoplasmático de EPOR, que sirven como sitios de anclaje para varias proteínas de señalización intracelular que contienen dominios SH2. Estas proteínas son a su vez fosforiladas y activadas en sus residuos tirosina.

Una de estas proteínas es el señalizador de transducción y activador de la transcripción 5 ó STAT5, que se disocia de EPOR y se transloca al núcleo para activar numerosos genes diana, tales como el Bcl-xL (*B-cell leukemia-2*), que es un inhibidor de la apoptosis. La expresión de la proteína STAT5 declina rápidamente en los estadios finales de maduración eritroide.

Así mismo, la EPO induce la activación de otros elementos como la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), que promueve la supervivencia eritroide. La PI3K fosforila la proteína quinasa B (PKB, Akt) y ésta última a su vez:

- 1) Fosforila e inactiva las moléculas proapoptóticas (Bad: *Bcl-2-associated death promoter*, Caspasa).
- 2) Fosforila el FOXO TF (*Forkhead transcription factor*), inhibiendo la traslocación al núcleo y la activación de los genes diana (ligando Fas, Bim).
- 3) Fosforila el I κ B (*Inhibitor of NF- κ B*), permitiendo la liberación del factor nuclear de transcripción NF- κ B que se transloca al núcleo y activa los genes diana de moléculas antiapoptóticas (XIAP, c-IAP2).

Ya dentro de la célula, el ligando Fas, Bim, XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*), c-IAP2 (*Inhibitor of apoptosis proteins-2*) y Bcl-X_L (*Bcl-2-like protein*) se encargan de llevar a cabo la eritropoyesis (20).

La unión de la EPO a ese receptor, también activa el factor Hsp70, que se une para inactivar las moléculas proapoptóticas (factor activador de proteasas apoptóticas-1 [Apaf-1] y el factor inductor de la apoptosis [AIF]).

De esta manera, por medio de la activación de JAK2, el EPOR induce múltiples vías de señalización, todas orquestadas en prevenir la apoptosis e inducir la proliferación y diferenciación terminal de los progenitores eritroides (18, 20).

Cuando cesa la producción de EPO, en respuesta al nivel de oxígeno, entra en acción la proteína SOCS-3 (supresor de la señalización por citoquinas-3), que se puede unir a EPOR o JAK2 fosforilados. La unión de las SOCS, por medio de su dominio SH2, a EPOR impide el acceso de las STATs. Las SOCS también son capaces de unirse a los restos de fosfotirosinas de las JAKs impidiendo su actividad quinasa. Por último, las SOCS facilitan la ubiquitinación de las JAKs, induciendo su degradación por los proteosomas (24).

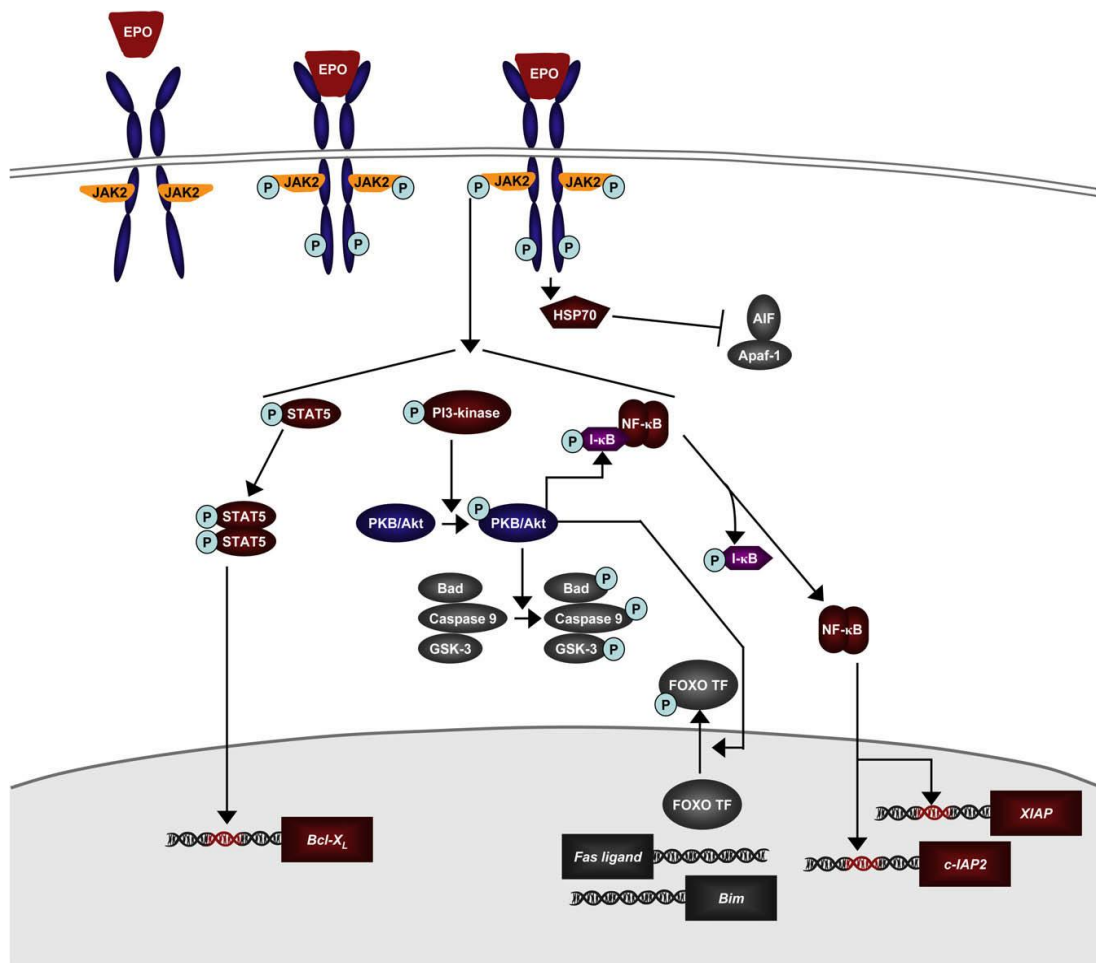


Figura 15: Esquema del mecanismo de señalización de la EPO.

Extraído de la bibliografía 20

6. FACTORES QUE MODULAN LA PRODUCCIÓN DE EPO: FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF)

La producción de la EPO es un proceso que depende, entre otros factores, de la concentración de oxígeno en la sangre y que está regulada a nivel transcripcional. En este sentido, se pueden diferenciar dos estados: i) la normoxia, o concentración normal de O_2 , y ii) la hipoxia, en la que la concentración de oxígeno es menor a la normal (24).

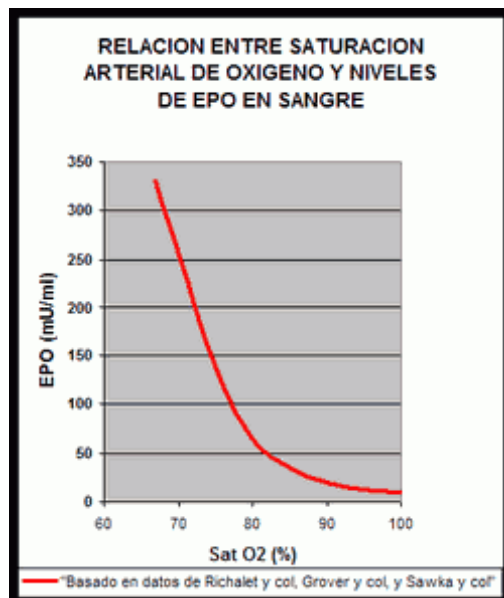


Figura 16: Relación entre saturación arterial de O_2 y niveles de EPO en sangre

Extraído de www.biolaster.com

Numerosos factores son los desencadenantes de la producción de eritropoyetina, entre los cuales se encuentran la angiotensina II que se encarga de aumentar la cantidad de EPO en plasma; otro factor sería el aumento del flujo sanguíneo y otro serían los sitios extra-renales que también se encargan de producir esta proteína, aunque el principal factor productor de eritropoyetina en el riñón es la hipoxia; habiéndose descrito hasta un aumento del 50% en su producción. La hipoxia puede surgir por diversas causas (18, 22, 25, 26):

- Disminución de la presión de O_2 ambiental, como ocurre en el caso de las hipobarías a grandes alturas.

- Disminución del transporte de oxígeno a nivel alveolar debido a obstrucciones o a enfermedades respiratorias.
- Disminución de la capacidad de transporte oxigénico. Un claro ejemplo son las anemias.
- Disminución del flujo renal (trombosis, ateroma...) y su consecuente disminución en la producción de eritropoyetina.

La regulación de la síntesis de la EPO está mediada por el HIF-1 (*Hipoxia induced factor-1*). Este factor es responsable de la activación de por lo menos 20 genes, entre los cuales se encuentran los de la EPO, la transferrina y el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF). En este proceso también influyen, pero de forma más minoritaria, el HIF- 2 y el factor nuclear del hepatocito 4 α (*Hepatocyte nuclear factor 4 α* , HNF-4 α) (18).

Los HIF son proteínas heterodiméricas que constan de:

- Una subunidad α , con una masa molecular de 120 kDa y tres isoformas diferentes 1 α , 2 α y 3 α , que se presentan en condiciones hipóxicas. Estas subunidades tienen diferentes funciones. El HIF-1 α / β es inductor de la hipoxia, el papel del HIF 2 α / β se está empezando a comprender en la actualidad y el factor HIF-3 α / β es un supresor de la hipoxia.
- Una subunidad β , con una masa molecular de entre 90 y 95 kDa, que es independiente de los niveles de O₂ en sangre (18, 22, 25).

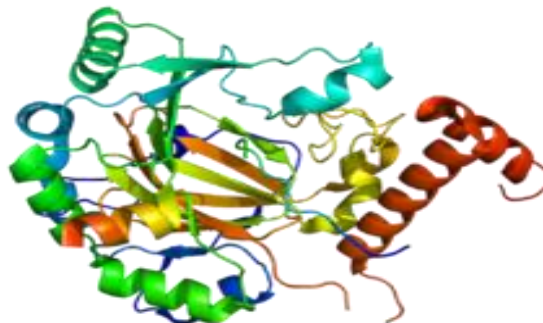


Figura 17: Esquema de la estructura general de los HIFs

Extraída de buscador Google

Ambas subunidades comparten cierta homología en sus extremos N-terminales, conteniendo un dominio bHLH (*basic helix-loop-helix*) y un dominio PAS, que están involucrados en la dimerización y en la unión al ADN. El extremo carboxiterminal de la subunidad α de HIF presenta dominios de degradación dependientes de O_2 (O-DDD) (5, 18, 19).

El RNA mensajero (RNAm) de ambas subunidades se expresa constitutivamente bajo cualquier condición. Sin embargo, la subunidad HIF-1 α sólo es detectable en hipoxia (18, 19).

En presencia de oxígeno, HIF-1 α sufre modificaciones post-traduccionales por parte de prolil hidroxilasas (PHD1, 2 y 3), que hidroxilan residuos de Pro^{402/564} localizados en el dominio O-DDD. Las PHDs contienen átomos de hierro (Fe^{2+}) que se encargan de transferir un átomo de oxígeno a la prolina (Pro) y otro al 2-oxoglutarato, dando lugar a dióxido de carbono (CO_2) y succinato. Estas modificaciones permiten la unión de la proteína VHL (von Hippel Lindau) a los sitios hidroxilados de HIF-1 α , provocando de esta manera su ubiquitinación por una ligasa (complejo E3 ubiquitina-ligasa) y su posterior degradación por el proteasoma (18).

En condiciones de normoxia, el HIF- 2 α también es hidroxilado en Pro⁴⁰⁵ y Pro⁵³¹ (18, 22, 25).

En ausencia de oxígeno, HIF-1 α se fosforila y transloca al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 β y se acopla a sus co-activadores CBP (proteína de unión a CREB -elemento de respuesta a AMPc-) y p300 (25, 27, 28, 29). De esta manera, HIF se une a la secuencia nucleótida reguladora del gen EPO (A/G) CGTG (27).

La actividad transcripcional de los HIFs se suprime mediante la hidroxilación por FIH-1 (factor Inhibidor de HIF-1, asparraginil-hidroxilasa) de HIF-1 α en Asn⁸⁰³ (en el dominio C-TAD) y de HIF-2 α en Asn⁸⁴⁷. La hidroxilación del residuo Asn⁸⁰³ constituye un impedimento estérico en la unión de los coactivadores transcripcionales CBP/p300 a HIF-1 α , necesaria para la transcripción. Al igual que las PDH, la FIH-1 contiene átomos de Fe^{2+} que actúan de la misma forma. (18, 22, 25).

En resumen, las enzimas proil-hidroxilasa y asparraginil-hidroxilasa son sensores del nivel de oxígeno celular. En condiciones de normoxia van a hidroxilar restos de Pro y Asn, para modular la producción de eritropoyetina (18).

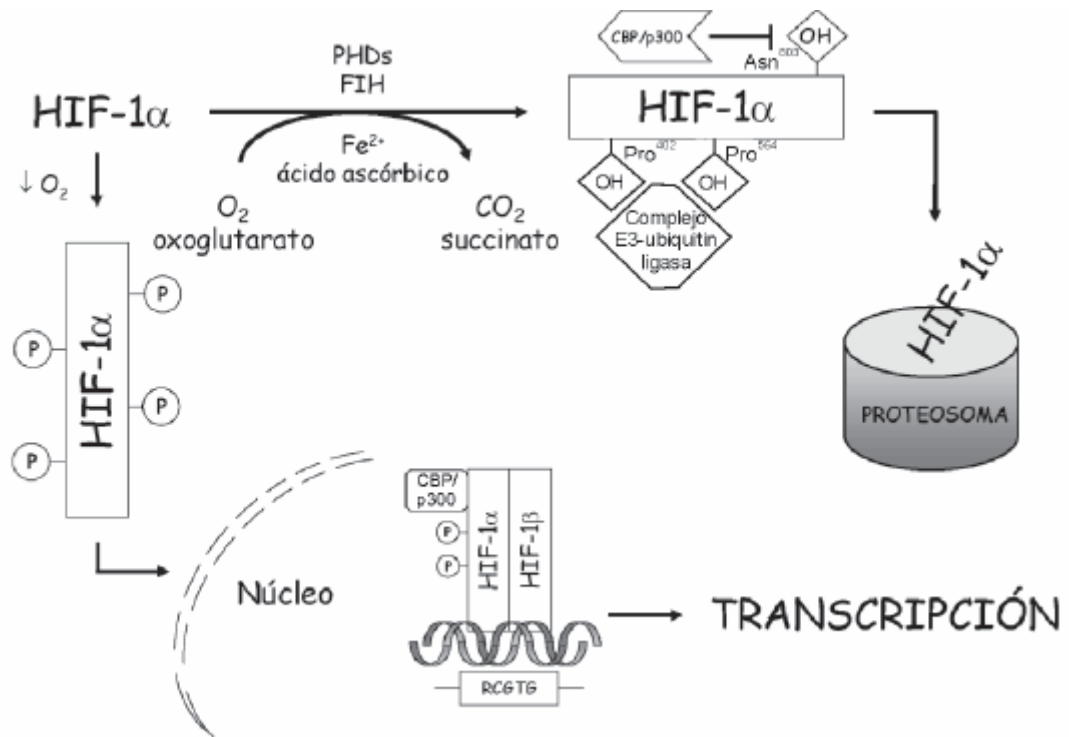


Figura 18: Esquema de hidroxilación de Pro y Asn y modulación de la producción de EPO

Extraída de buscador Google

7. DERIVADOS DE LA EPO: AGENTES ESTIMULANTES DE LA ERITROPOYESIS (ESAs) QUE SE UNEN A SU RECEPTOR (EPOR).

Cuando en 1985 se consiguió la clonación de la EPO, se pudieron conocer sus características inmunológicas y biológicas, desarrollándose a partir de entonces las proteínas recombinantes y los derivados de la EPO. Todos ellos se encargan de realizar la misma función que la EPO endógena, presentando algunas variaciones en su estructura (30).

Los derivados de la EPO se pueden diferenciar en dos grandes grupos, según el tiempo de permanencia en el organismo en el que se introducen (31):

- ESAs de corta duración: Dentro de las cuales se encuentran las epoetinas.
- ESAs de larga duración: Entre las que se encuentran la darbopoetina α y la CERA (*Continuous Erythropoietin Receptor Activator*).

Todas las epoetinas poseen una secuencia de aminoácidos similar a la de la EPO endógena (EPOe), aunque con un patrón de glicosilación distinto. Para diferenciarlas, y de acuerdo con la Organización Internacional de la Salud (WHO), se les añade como sufijo una letra griega a cada una de ellas (17, 19).

7.1. Epoetina α .

Se trata de la primera proteína recombinante introducida en 1989 en el ámbito comercial (sobre todo en Estados Unidos y la Unión Europea). Junto a la epoetina β forma parte de las denominadas proteínas recombinantes de primera generación (17, 19, 21).

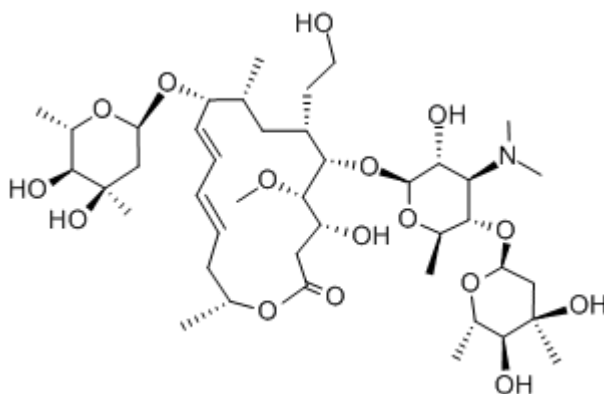


Figura 19. Estructura química de la epoetina α .

Extraída de <http://www.chemicalbook.com>

Producida a partir de cultivos de una línea celular de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*), llamada CHO (*Chinese Hamster Ovary*), que son transfectados con el gen de la EPO. Esta proteína posee la misma secuencia de aas que la EPOe, pero los diferentes procesos de manipulación que sufre hacen que aumente su masa molecular con respecto a la rhuEPO, fundamentalmente debido a un aumento de glicanos con N-acetilactosamina en su composición molecular (5, 19, 21, 30).

La vida media epoetina α en el organismo es equivalente a la de la epoetina β , siendo de unas 6-8 horas cuando su administración es intravenosa (i.v) y de 19-24 horas si la administración es subcutánea (s.c). En comparación con la epoetina β , presenta mayor cantidad de ácido siálico. Los N-glicanos constituyen un 19% de la estructura y el 95% de las isoformas de la proteína contiene O-glicanos, aunque presenta menos isoformas que la epoetina β . Además una de las grandes diferencias con respecto a la EPO humana es que la epoietina α contiene ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), que no puede ser sintetizado por las células humanas y sí por las CHO (17, 19).

Su administración se suele realizar dos o tres veces a la semana. Se suele aplicar en casos de anemias de origen renal a pacientes sujetos a hemodiálisis, cuando el objetivo que buscamos es el de aumentar la concentración de hemoglobina en sangre (30).

7.2. Epoetina β .

Se trata de la otra rhuEPO de primera generación, aunque su uso comercial fue algo más tardío que la α , fue en 1990 bajo el nombre de Recormon y sólo era disponible fuera de USA (17, 19).

Esta proteína también se sintetiza en las CHO, pero presenta un mayor número de isoformas, lo que facilita la diferenciación de ambas en un control antidoping. Su vida media en sangre es similar a la de la epoetina α , así como su masa molecular y uso clínico. La otra diferencia es la de presentar más oligosacáridos tetra sializados que la alfa (46%) (19, 30).

7.3. Epoetina ω .

Es una proteína producida en una línea celular de células renales de hámster dorado sirio (*Mesocricetus auratus*), conocida como células BHK (*Baby Hamster Kidney*), que difiere de las otras epoetinas por su perfil de glicosilación. El número de isoformas básicas es también mayor que el de la epoetina β y tan solo el 60% de las isoformas tiene O-glicanos. También se observan en su estructura N-glicanos con restos de manosa; estos N-glicanos están sulfatados, fosforilados y contienen más residuos de Neu5Ac (ácido N-acetilneuramínico) (5, 19, 20, 21).

Su primer nombre comercial fue Epomax y su comercialización se extendió a Asia, Europa del Este y América Central, aunque en la actualidad sólo se comercializa en el sur de Asia (19, 20, 21).

7.4. Epoetina δ .

Se trata de la cuarta epoetina más utilizada en el ámbito comercial y recibe el nombre de Dynepo. Se produce en células cultivadas de fibrosarcoma humano (HT-

1080) y se usa principalmente en el tratamiento de las enfermedades crónicas renales. En relación a las demás epoetinas, contiene ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) y un mayor número de isoformas que las demás. Se puede diferenciar del resto de epoetinas mediante el método de detección SDS-PAGE, ya que presenta un perfil muy diferente (17, 19).

7.5. Otras epoetinas.

Existen otras epoetinas menos utilizadas en el ámbito comercial, entre las que se encuentran las epoetinas zeta y theta. Estas se utilizan en anemias asociadas a insuficiencia renal crónica (19, 30).

Otro grupo lo constituyen las proteínas biosimilares, que son proteínas de bajo coste debido a que las patentes han expirado. A pesar de ello son manipuladas y distribuidas por todo el mundo bajo diferentes nombres (HEXAL, Epoxino...). Se diferencian fácilmente mediante electroforesis (19).

7.6. Darbopoetina α .

Se trata de un ESA de larga duración en el organismo que fue aprobada en el mercado en los años 2002 (en USA) y 2003 (en UE). Producida por la mutación de la secuencia original de la EPO con la tecnología del DNA recombinante en las CHO (19, 21, 30).

Comparada con la rhuEPO presenta cambios en la secuencia de aminoácidos que permiten la unión de oligosacáridos a restos de asparragina (Asn) produciendo de esta manera dos nuevos enlaces N-carbohidrato: los cambios son: Ala³⁰ por Asn³⁰ y Trp⁸⁸ por Asn⁸⁸ (5, 19, 20, 21, 30).

Tiene el mismo mecanismo de acción que la EPO. Sin embargo, su vida media en sangre es tres veces mayor que la de las epoetinas alfa y beta (24- 26 horas por vía i.v y 48 horas por vía s.c); ello se debe a la presencia de los dos enlaces N-glicano mencionados. Su peso molecular es mayor que el de la rhuEPO (37,1 kDa vs 30,4 kDa), contiene más residuos de ácido sialico (22 vs 14), y por lo tanto más carga negativa, y posee 4,3 veces más afinidad relativa por el receptor EPO, lo que significa que su dosificación puede ser menor. Su administración óptima es de una vez a la semana o una vez cada dos semanas, aunque en pacientes clínicamente estables es posible una administración al mes (5, 20, 30).

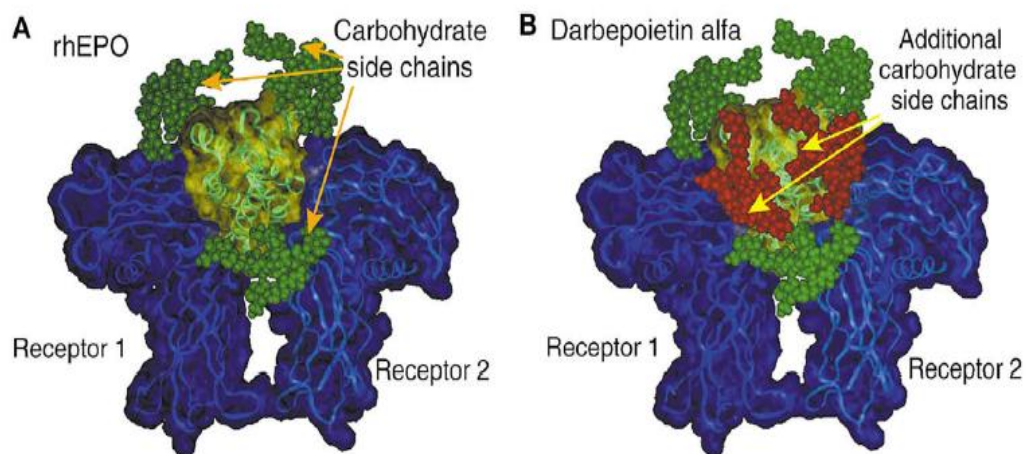


Figura 20. Estructura molecular de rhuEPO y darbopoetina α .

Extraída de la bibliografía 20

Un hecho muy importante en lo que a deporte se refiere fue el descubrimiento de esta proteína mediante el método de IEF, gracias al cual se detectaron tres positivos en los juegos Olímpicos de Invierno de Salt Lake City en 2002, entre los cuales se encontraba el esquiador de fondo español Johann Muehlegg.

Existe un tipo de darbopoetina alfa, la NESP (*Novel Erythropoiesis Stimulating Protein*), que se produce en las CHO y se vende comercialmente bajo los nombres de Aranesp y Nespo. Debido a los cambios en la glicosilación, ESP puede diferenciarse de otras eritropoyetinas por los métodos de IEF y SDS-PAGE (21).

A continuación, se incluye una tabla con las principales coincidencias y diferencias entre la proteína recombinante humana y la proteína NESP:

	rhuEPO	NESP
Nº aminoácidos (aas)	165	165
Secuencia aas	Idem EPOe	Distinta EPOe
Puentes disulfuro	2	2
Peso molecular (Daltons)	30400	37100
Punto isoelectrico	4,4,-5,1	3,0-3,9
Nº isoformas	5rhuEPO α 6rhuEPO β	5
Nº cadenas N- glicosilación	3	5
Nº residuos ácido siálico	Hasta 14	Hasta 22
% Hidratos de Carbono	40%	52%

Tabla 3: Comparación estructural de rhuEPO y darbopoetina α (NESP).

Extraída de la bibliografía 32

	<u>Intravenosa</u>	<u>Subcutánea</u>
Epoetina α	4-11 horas	19-25,3 horas
Epoetina β	8,8-10, 4 horas	24 horas
Darbopoetina α	18- 25,3 horas	48,8 horas

Tabla 4: Vida media en sangre de las distintas ESAs.

Extraído de la bibliografía 19

7.7. CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator).

Es una ESA reciente obtenida gracias a la adición de polietilenglicol soluble en agua a la epoetina β (Peg β), por lo que su masa molecular se ve considerablemente aumentada (60 kDa) y su vida media en el torrente sanguíneo es mayor (hasta 130 horas tras su administración i.v y s.c). Debido a la alta masa molecular y a su estructura alterada es fácil de detectar mediante IEF y SDS-PAGE (2, 19, 30).

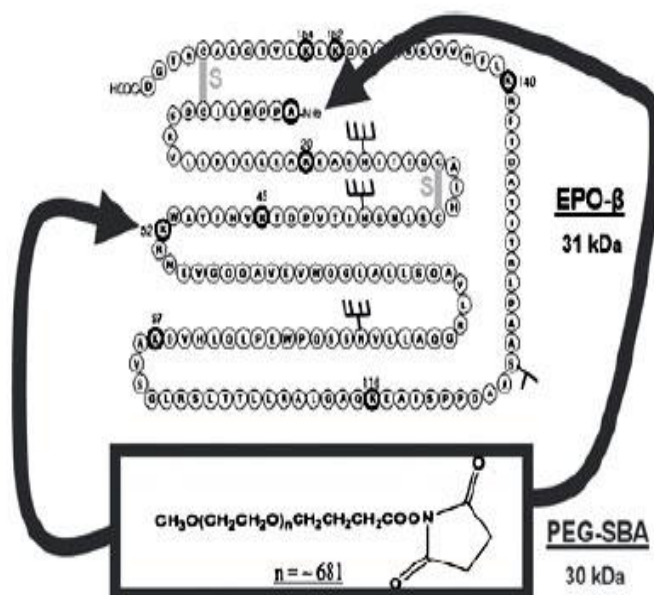


Figura 21: Estructura química CERA

Extraída de <http://www.scielo.cl>

La afinidad de la CERA por EPOR es entre 50-100 veces menor que la de la epoetina β , lo que indica que la unión al receptor es muy breve. A pesar de esta baja afinidad, estudios realizados en animales muestran que su respuesta hematopoyética es mayor que la de las epoietinas α y β , indicando por lo tanto un alto potencial *in vivo* (30).

Este análogo de la EPO tiene uso tanto en el ámbito sanitario como en el deportivo. En lo que a salud se refiere, generalmente se utiliza para aumentar los niveles de Hb sanguínea en pacientes con anemia de origen renal, pudiendo llevarse a cabo un buen tratamiento con la administración de una sola dosis mensual. Mientras que en el aspecto deportivo el objetivo que se busca es el de aumentar el número de eritrocitos y, por lo tanto, la capacidad física del deportista (2, 30).

7.8. Hematide.

Es un péptido mimético de la EPO que se une al EPOR de la misma forma que lo hace la rhuEPO. Las diferencias estructurales que presenta con la EPOe hacen que su vida media en suero sea mayor y que los métodos de detección también sean diferentes.

Actualmente se encuentra en fase clínica 3, habiéndose desarrollado para uso médico en el tratamiento de la anemia. A pesar de ello, su uso aún no es legal, no habiendo sido aprobado por los comités sanitarios pertinentes (21).

Agente/ Método	Origen/Manipulación	Método detección
<u>ESAs</u>		
Epoetina α y β	Células transfectadas de CHO	IEF, doble inmunoblotting, LD, electroforesis, MALDI-TOF e IT/RTOF MS.
Biosimilares a la epoetina α (epoetina zeta)	Células transfectadas de CHO	IEF, doble inmunoblotting.
Epoetina ω	Celulas transfectadas de BHK	IEF, doble inmunoblotting.
Epoetina δ	Células HT-1080. Promotor transfectado CMV	SDS-PAGE.
CERA	Células transfectadas de CHO con modificación química postranslacional	IEF, doble inmunoblotting, ELISA, SDS-PAGE
Darbopoetina α	Células de CHO mutadas (hiperglicosiladas)	IEF, doble inmunoblotting
<u>Miméticos EPO</u>		
Hematide	Síntesis química	ELISA?

Tabla 5: Origen y método de detección de los diferentes ESAs.

Extraído de la bibliografía 5

8. INDICACIONES CLÍNICAS DE LA EPO.

La administración de la eritropoyetina está indicada en distintos tipos de patologías, que quedan reflejadas en la figura 22. De forma más frecuente (sobre un 84% de los ensayos clínicos revisados) se utiliza para el tratamiento de anemias, ya sea de origen renal, no renal o relacionadas con el cáncer.

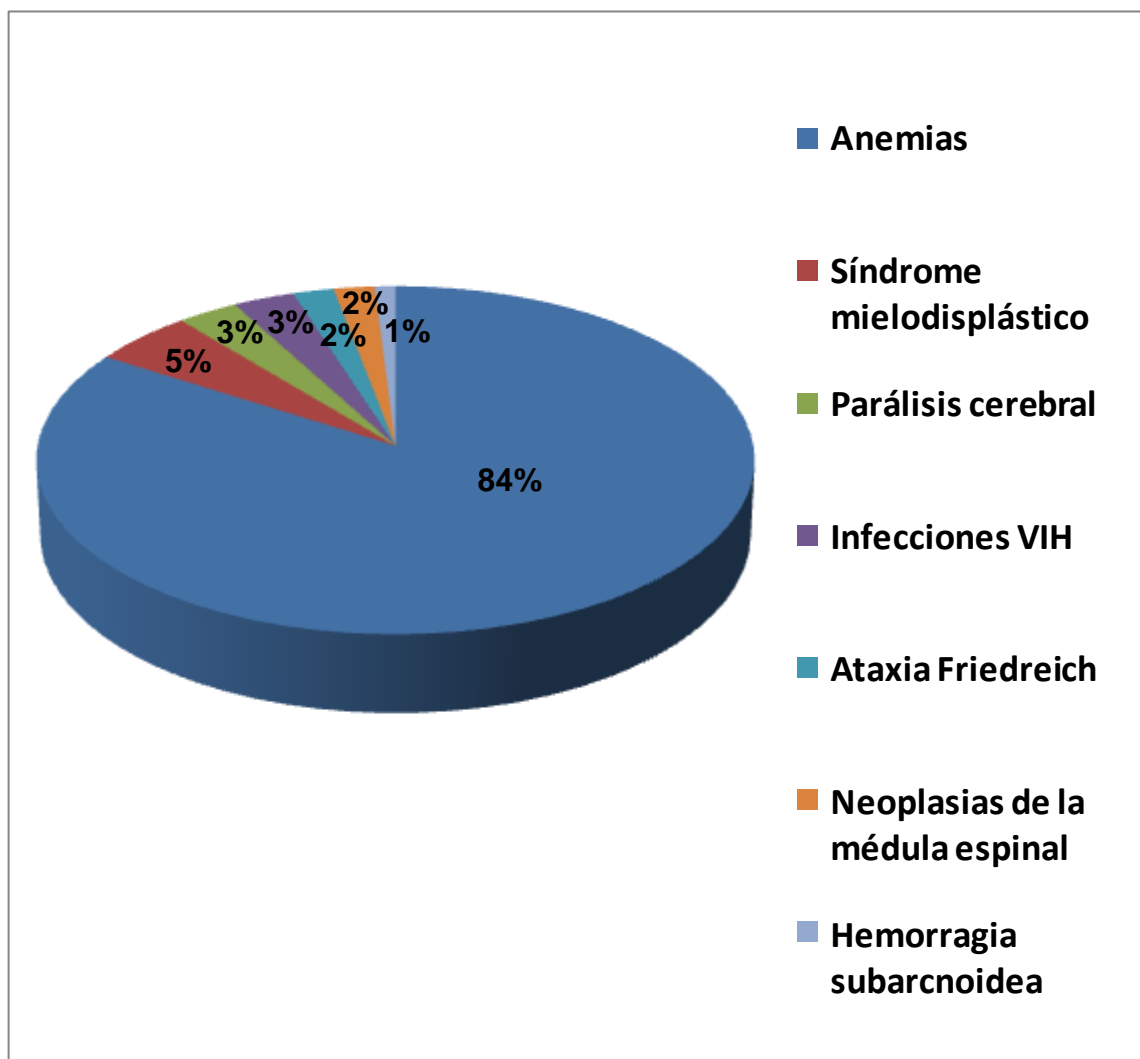


Figura 22: Gráfico de indicaciones clínicas de la eritropoyetina

Resultados obtenidos en la página de Ensayos Clínicos de PubMed y posteriormente analizados: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (Clinical Trials)

Para el tratamiento de estas enfermedades se utiliza la rhuEPO en forma de dímeros, trímeros o péptidos miméticos que se unen al EPOR. Debido a su potencial eritropoyético, la rhuEPO es comúnmente utilizada para el tratamiento de anemias en pacientes que padecen insuficiencias renales, cuyos riñones no producen EPO en cantidad suficiente, o que se encuentran en tratamiento con quimioterapia (18).

Antes de que las anemias se trataran con rhuEPO, habitualmente se recurría a las transfusiones sanguíneas; sin embargo, este método implicaba una serie de riesgos importantes, como son la transmisión de enfermedades o la existencia de reacciones inmunes. Dichas patologías también se trataban mediante la administración de suplementos de hierro, resultando un método muy inefectivo. A partir de aquí se comenzaron a realizar estudios, que demostraron el efecto beneficioso de la EPO recombinante en el tratamiento de esta enfermedad (20).

Como ya se ha indicado anteriormente, la anemia, debida sobre todo a una insuficiente producción de EPO o a un acortamiento en la vida de los eritrocitos, es la principal indicación clínica para el tratamiento con esta proteína. Cuando está asociada a una insuficiencia renal, presenta una buena eficacia clínica y baja toxicidad.

El tratamiento con proteínas recombinantes de las anemias de origen renal puede efectuarse por vía i.v o subcutánea (s.c), administrándose epoetinas y darbopoetinas. Están indicadas en pacientes sometidos a hemodiálisis (adultos y niños) o a diálisis peritoneal continua ambulatoria (adultos), así como a pacientes en estado de prediálisis como medida preventiva (18, 33).

Además de las anemias renales, la eritropoyetina también se emplea en el tratamiento de anemias en pacientes con tumores sólidos sometidos a quimioterapia. La administración de EPO produce una mejora de la anemia, favoreciendo la oxigenación de los tejidos afectados y, por tanto, mejorando la respuesta del paciente al tratamiento con quimioterapia, lo que de forma indirecta ayuda a la remisión del cáncer. Cuando se administra antes del tratamiento con quimioterapia, se puede observar que hay un aumento en la concentración de hemoglobina, produciendo de esta manera una reducción de las transfusiones sanguíneas necesarias en estos casos.

Otro tipo de anemias en los que se emplea la eritropoyetina son las anemias de los prematuros, bebés que nacen con un peso comprendido entre 750 y 1500 gramos y que pasan un periodo de gestación inferior a 34 meses. Como estos niños reciben muchas transfusiones para mejorar la oxigenación de su organismo, el tratamiento con rhuEPO es efectivo en estos casos (33).

Pero el uso de la EPO recombinante no solo se reduce al tratamiento de las anemias, sino que también existen otras indicaciones, como el tratamiento de: lesiones medulares (como la ataxia de Freidreich), procesos isquémicos cerebrales, enfermedades autoinmunes, VIH y síndromes mielodisplásicos, debido a las propiedades neuroprotectoras, antiinflamatorias y neurotrópicas de la EPO (18, 33).

Por último, indicar que también se han realizado investigaciones sobre el tratamiento con EPO de otro tipo de enfermedades, como es el caso de la parálisis cerebral (sobre todo las infantiles) o la hemorragia subaracnoidea, aunque es necesario que se lleven a cabo más investigaciones para que se cuente con datos más concretos y fiables sobre esta posible nueva terapia (33).

9. EFECTOS ADVERSOS DE LA EPO. CÁNCER

El uso clínico de la eritropoyetina presenta, tal y como se ha indicado anteriormente, efectos beneficiosos, sobre todo en lo que se refiere al tratamiento de las anemias. Pero también hay que destacar que cuenta con distintos efectos adversos, dentro de los cuales uno de los más relevante sería el cáncer.

A este respecto, una de las primeras cuestiones planteadas fue desvelar si las células tumorales presentan o no EPORs y si estas células promueven la producción de la proteína. Estudios iniciales *in vitro* realizados en células tumorales no demostraron que la rhuEPO fuera capaz de estimular el crecimiento de las mismas (19). Pero gracias a la realización de diversos ensayos clínicos *a posteriori*, se pudieron obtener datos acerca de cómo la EPO puede influir en la estimulación del crecimiento de un tumor (34).

Diversos trabajos posteriores han demostrado la presencia del EPOR en carcinomas de pulmón, cuello de útero, hígado, riñón y órganos reproductores, entre otros. Además se ha demostrado que la estimulación por EPO de líneas celulares cancerígenas y de células endoteliales microvasculares puede generar una señal de transducción (19, 34, 35).

La presencia de EPOR en los tejidos tumorales podría estar incrementando las posibilidades de aparición de un cáncer. Esta hipótesis es sopesada por diversos ensayos clínicos, los cuales muestran un menor índice de supervivencia en aquellos pacientes con cáncer que han sido tratados con rhuEPO (33). Además de esos efectos en las células tumorales, la EPO podría ser capaz de estimular la proliferación de un tumor por su efecto angiogénico (formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes), por inhibir la apoptosis celular o también mediante la inducción de cualquiera de los factores que favorecen la proliferación de un tumor (34, 35).

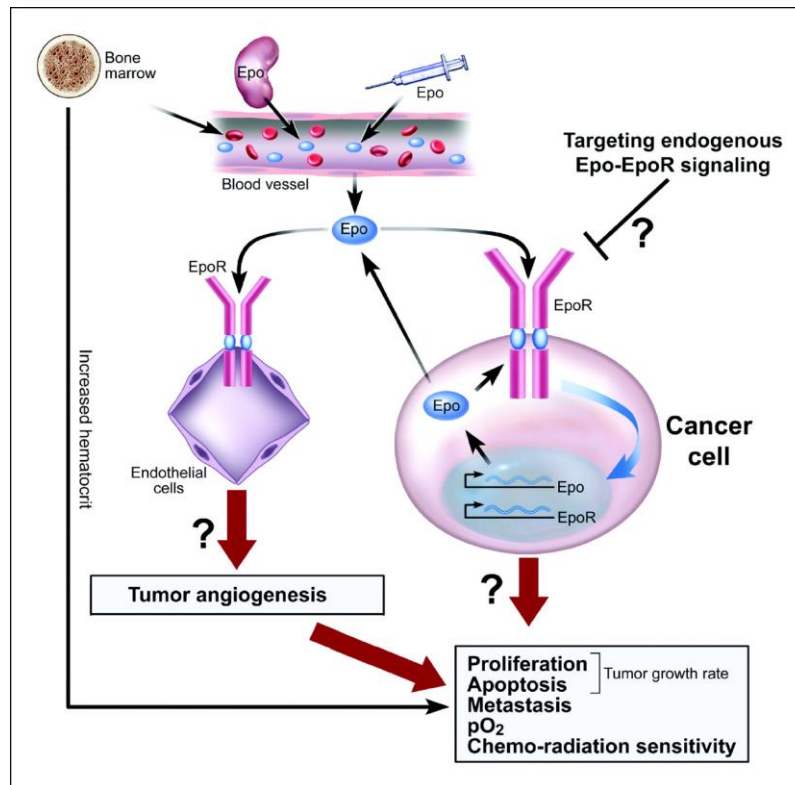


Figura 23: Potenciales efectos de la señalización EPO-EPOR en tumores.

Extraída de buscador Google.

Por lo tanto surge aquí una paradoja con respecto a la EPO y el cáncer, ya que puede estimular la progresión de la formación de células tumorales (y de hecho se ha demostrado que la regresión del tumor se puede inducir mediante la inhibición de la señalización de esta proteína) pero también puede revertir la anemia elevándose los niveles de EPOe (EPO endógena), que resultan perjudiciales para la proliferación del tumor (19, 34). En otras palabras, quizás una de las razones por las que la anemia es perjudicial en un proceso cancerígeno es este aumento en los niveles de EPOe. En este caso es importante saber cuál es la cantidad de EPO administrada a cada paciente en cada momento para llevar un control de la presencia de ésta en el cuerpo del paciente (34).

A parte del principal efecto adverso del cáncer, la administración de la eritropoyetina cuenta con otros muchos efectos entre los cuales se encuentran los siguientes (15, 19, 33):

- Aplasia de las células rojas en pacientes con insuficiencia renal crónica:
En la mayoría de los pacientes a los que se les administró epoetina α por vía subcutánea, se observó la presencia de anticuerpos antieritropoyetina en suero; muchos de los pacientes necesitaron transfusiones de manera regular y no respondieron al tratamiento con otro tipo de proteínas recombinantes eritropoyéticas.
- Hipertensión arterial: Tanto la aparición de ésta como su exacerbación son dos de los principales efectos adversos de la EPO. Se produce un aumento de la tensión dependiente de la dosis aplicada durante los primeros 3 meses de tratamiento, con el consiguiente aumento del hematocrito; si éste último supera el 60%, el flujo sanguíneo disminuye junto al ritmo cardiaco aumentando las posibilidades de infarto y de fallo cardiaco. Esto último se ha demostrado en experimentos realizados con ratones y monos, que experimentaron infartos tras la administración de esta proteína.
- Trombosis: El tratamiento con EPO puede ocasionar un exceso en la producción de eritrocitos, con el consiguiente aumento de la viscosidad sanguínea, sobrecargando al corazón. Aumenta el riesgo de la formación de trombos en las arterias coronarias, de la aparición de embolias pulmonares y de accidentes cerebrovasculares.



Figura 24: Algunos efectos beneficiosos y perjudiciales de la administración de la EPO

Extraída de buscador Google

- Efectos sobre el SNC: En algunos estudios se ha descrito la presencia de convulsiones tónico-clónicas en pacientes con VIH que reciben tratamiento con esta proteína. También se han descrito cefaleas, posiblemente relacionadas con la administración de epoyetina.
- Síntomas gripales: Cefaleas, mialgias, sensación distérmica, parestesias...
- Reacciones cutáneas inespecíficas.
- Alteraciones hidroelectrolíticas: Hipercalcemia, hiperfosfatemia.

10. MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL DOPAJE

La EPO recombinante llegó a Europa en el año 1987. Dada su capacidad para aumentar el transporte de oxígeno en la sangre se viene empleando de manera fraudulenta en los deportes de resistencia.

La primera federación que la prohibió fue la Federación Internacional de Esquí en 1988 y dos años más tarde, en 1990, la comisión médica del Comité Olímpico Internacional (COI) se encargó de prohibirla de manera definitiva. Este fue el comienzo de las políticas antidopaje y del desarrollo de diferentes métodos de detección con el objetivo de crear un deporte limpio y justo (3).

Ante esta situación se han desarrollado una serie de métodos de detección, que se pueden dividir en directos e indirectos (4).

10.1. Métodos indirectos

Los métodos indirectos requieren de una extracción sanguínea, debido a que los parámetros se determinan en sangre o suero. El gran inconveniente de estos métodos es la imposibilidad de una muestra de contraanálisis, dada la inestabilidad de los parámetros sanguíneos. Presentan como ventaja que son métodos rápidos y relativamente baratos. En la actualidad se usan como base de medidas y sanciones, especialmente con la introducción del ABP (*Athletes Biological Passport*) por parte de la UCI (Unión Ciclista Internacional) (19, 36).

El análisis en sangre se basa en la determinación de tres parámetros hematológicos: hematocrito, hemoglobina y reticulocitos. Algunos de estos parámetros pueden permanecer aumentados hasta cuatro semanas tras la administración de EPO, haciendo posible la detección del dopaje (4):

10.1.1. Hematocrito

Se define como el porcentaje del volumen total de la sangre compuesta por glóbulos rojos. Su valor normal se encuentra entre 40.3 y 50.7 % en los hombres, y entre 36.1 y 44.3 % en las mujeres. Ante un valor por encima del 50% existen sospechas razonables de un posible caso de dopaje. Existiendo también un riesgo potencial de hipertensión y colapso, que ponen en peligro la vida del deportista (5, 30, 37).

10.1.2. Hemoglobina

Tanto las transfusiones de sangre como las inyecciones de rhuEPO provocan un aumento de la concentración de hemoglobina. Por lo tanto, si en la realización de un análisis los valores de ésta se encuentran por encima de lo normal, existirá la sospecha de que se haya existido dopaje.

10.1.3 Reticulocitos

Son glóbulos rojos que aún no han llegado a su madurez completa. Al igual que sucede con la Hb, la administración de EPO aumenta el número de reticulocitos, alimentando la duda de un posible dopaje (37).

10.2. Métodos directos

La detección directa de la EPO generalmente se lleva a cabo en sangre o en orina, presentando la ventaja de la fácil obtención de la muestra biológica a analizar; la extracción de tejido en el dopaje genético, es una excepción. Por el contrario, presentan la desventaja del elevado precio de su realización, así como su baja sensibilidad. Además hay que tener en cuenta un problema añadido: la EPO

recombinante humana (rhuEPO) es prácticamente igual, en lo que a estructura se refiere, a la EPO endógena (EPOe) (4, 25, 37).

Existen distintos métodos directos de detección de eritropoyetina, entre los cuales se encuentran los siguientes:

10.2.1. Isoelectroenfoque (IEF)

Concentración de la muestra. Dada la baja concentración de EPO, tanto en suero como en orina (130-230 pg EPO/ml que corresponde a 10-18 mUI/mL), es necesario concentrar la cantidad de proteína en la muestra para alcanzar la sensibilidad que éste método requiere. Esto se realiza mediante sucesivas centrifugaciones y ultrafiltraciones (empleando filtros de tamaño de poro de 30000 Da., quedando la EPO retenida en ellos).

Electroforesis. Se trata de un proceso que permite que las proteínas se separen en función de su punto isoelectrico (pI), mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de un gradiente de pH (que suele variar entre 2 y 6). Las diferencias entre esos puntos isoelectricos son los que se detectan mediante el método (4, 19, 34, 31, 32). Dicho procedimiento se utiliza para la detección de rhEPO (alfa y beta) y Darbepoetin alfa (NESP).

Durante este proceso se lleva a cabo la migración de las proteínas en un gel hacia el polo positivo o el polo negativo en función de su carga neta. Dicha carga depende del punto isoelectrico (pI) de la proteína y del pH del medio en el que se desarrolle la electroforesis. Cuando el pH del medio sea menor que el punto isoelectrico, la carga neta que adquiere la proteína es positiva y migra hacia el cátodo (polo negativo); mientras que en el caso de que el pH sea mayor que el pI la carga neta es negativa y las proteínas migran hacia el ánodo (polo positivo), hasta encontrar un pH en el cual su carga neta sea nula, este pH se denomina pI (Figura 25). Es decir, cuando el pH del medio y el pI coinciden, la carga neta es cero y por lo tanto se detienen y ya no migran.

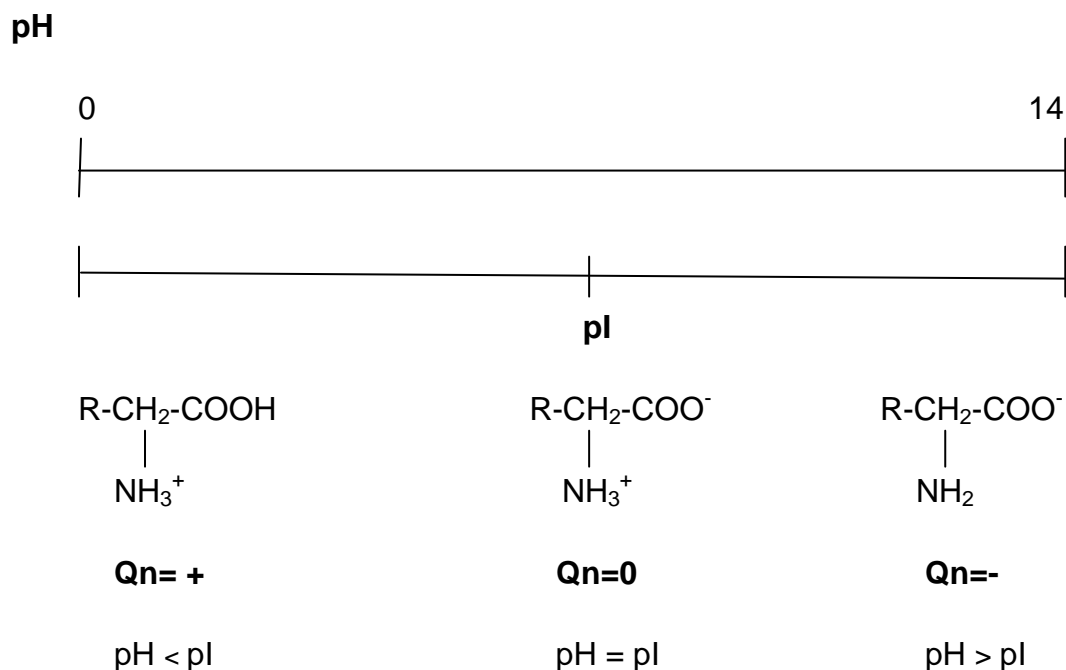


Figura 25: Esquema de la variación en la carga neta de los aminoácidos, en función del pH del medio.

Esquema propio del alumno.

Las modificaciones post-traduccionales (como las N- y las O-glicosidaciones) hacen que el patrón de glicosilación sea diferente en función del tipo celular que sintetice la proteína; la glicosilación en bacterias es diferente a la de las células humanas. Esta heterogeneidad en la glicosilación de la EPO permite la separación de los distintos tipos de isoformas de la proteína.

La electroforesis normalmente se realiza en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, *polyacrilamide gel electrophoresis*), aunque también se ha efectuado en gel de agarosa.

Electroforesis en **gel de poliacrilamida**. La poliacrilamida es un polímero que presenta la ventaja de que es inerte, transparente y estable en un amplio rango de pHs, temperatura y fuerza iónica. Este método emplea como medio detergente el dodecilsulfato sódico (SDS), elemento que desnaturaliza las proteínas y confiere una

carga negativa casi uniforme a lo largo de la longitud de la cadena polipéptidica, encargándose de separar las proteínas según su masa molecular.

Con este método se ha demostrado la diferencia de masa molecular entre la EPOu (34 kDa) y la rhuEPO (36-38 kDa), diferenciándose de esta manera la concentración de ambas en los controles antidoping (19, 32).

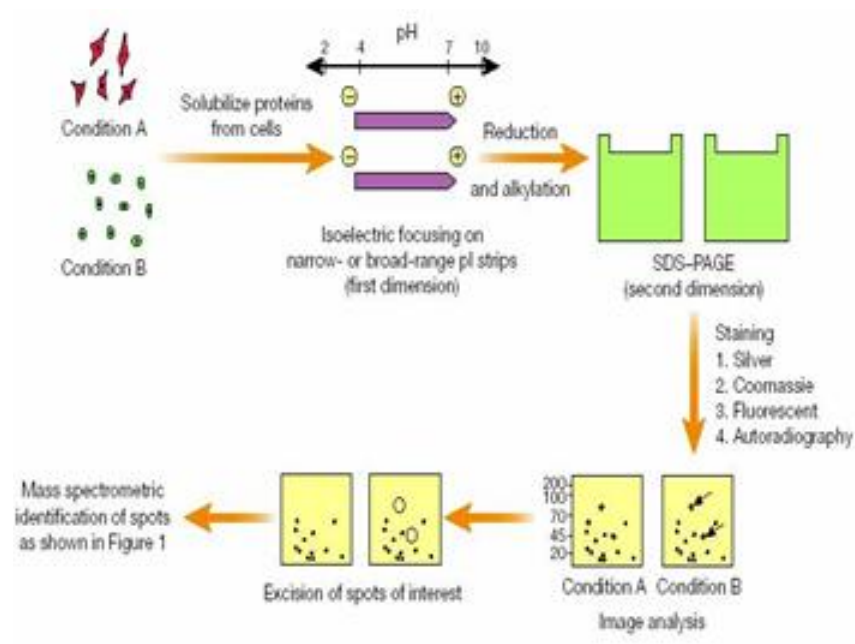


Figura 26: Esquema de electroforesis en gel de poliacrilamida

Extraída de <http://bioinformatica.uab.es>

Antes de aplicar las muestras en el gel, a la disolución se le añade Rojo de Metilo, lo que permite controlar la migración en el tiempo, a lo largo de toda la longitud del gel.

Electroforesis en gel de agarosa. La agarosa es un polisacárido que en disolución es líquido a temperaturas mayores de 50°C y que forma un gel semisólido al enfriarse. Mediante el estudio de la movilidad electroforética y comparando los valores de movilidad de rhuEPO y EPO dedujeron que este método podía ser útil para la separación de moléculas de gran tamaño en sangre y por lo tanto la detección de dopaje en sangre (19).



Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa

Extraída de <http://idibam.blogspot.com.es>

Transferencia. Una vez realizada la electroforesis, se lleva a cabo la transferencia/inmovilización de las proteínas sobre membranas de nitrocelulosa PVDF (*polyvinil difluoride*). Estas membranas son hidrofóbicas, más manejables, con gran resistencia mecánica, con una elevada afinidad por las biomoléculas y son compatibles con la detección por quimioluminiscencia (35).

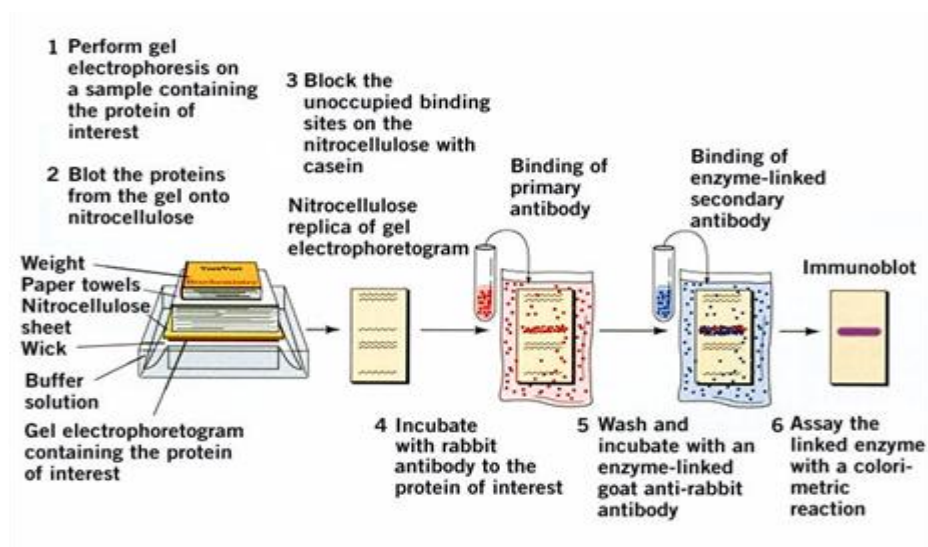


Figura 28. Esquema de método de inmunotransferencia

Extraída del buscador Google

Después de la transferencia, la membrana se incuba con Ditioneitol para romper los puentes disulfuro de la molécula de EPO (aa7-aa161, aa29-aa33). Al no haber puente disulfuro entre aa7 y aa161, el anticuerpo primario tiene un mejor acceso al fragmento de reconocimiento (aa1-aa26), aumentando la sensibilidad del método.

Bloqueo. A continuación se lava la membrana y se incuba con leche para saturar la membrana, bloqueando los sitios libres en los que no hay proteínas, es decir, los lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia. En caso contrario, el anticuerpo (de naturaleza proteica) empleado en la detección puede unirse a ellos.

Detección. Posteriormente, se incuba con el **anticuerpo primario** (anticuerpo monoclonal anti-EPO) que se une de manera específica a las moléculas de EPO presentes en la membrana.

Tras lavar la membrana, para eliminar el anticuerpo primario que no se ha unido, se incuba con el anticuerpo secundario. Este último reconoce de forma específica una región concreta del anticuerpo primario. A continuación se vuelve a lavar la membrana y se cubre la superficie con un reactivo quimioluminiscente.

La detección por quimioluminiscencia, se basa en la detección de antígenos inmovilizados conjugados con Horseradish Peroxidase (HRP), que están unidos a anticuerpos. La HRP, junto con un catalizador de la reacción, favorece la oxidación de un sustrato, que genera luz quimioluminiscente al ser oxidado. La señal resultante es detectada en una placa de radiografía, apareciendo en forma de banda oscura (4, 19, 31, 32, 34).

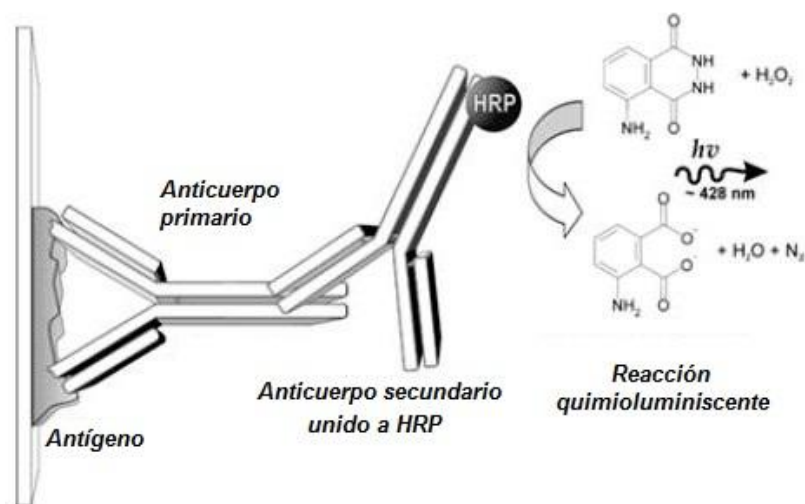


Figura 29. Esquema de detección por quimioluminiscencia.

Extraída de bibliografía 36

La imagen obtenida, como podemos ver en la figura 30, es la representación de los perfiles electroforéticos de las muestras y de los controles de referencia cargados en el gel. Cada calle se corresponde con el perfil de migración de la EPO en cada una de las muestras; por lo tanto, tendremos tantas calles como muestras fueron aplicadas en el gel de electroforesis. Dentro de una calle, tenemos un número determinado de bandas, que se corresponden con el número de isoformas de EPO en cada muestra. La intensidad de luz generada es proporcional a la concentración de la proteína, de manera que en una calle, la isoforma más abundante corresponderá con la de mayor luminosidad, observándose como una banda más oscura.

En cuanto a la interpretación de los resultados con rhuEPO, decir que es muy compleja (35). Para considerar un dopaje como positivo deben aparecer al menos tres bandas consecutivas en la zona básica (Figura 30). Mientras que para probar el mal uso de la darbopoetina α se deben observar al menos tres bandas consecutivas en la zona ácida.

Este método presenta ciertos inconvenientes tales como la inestabilidad de las muestras, ya que la orina al contener neuraminidasa y arylsulfatasa altera el patrón del IEF (5).

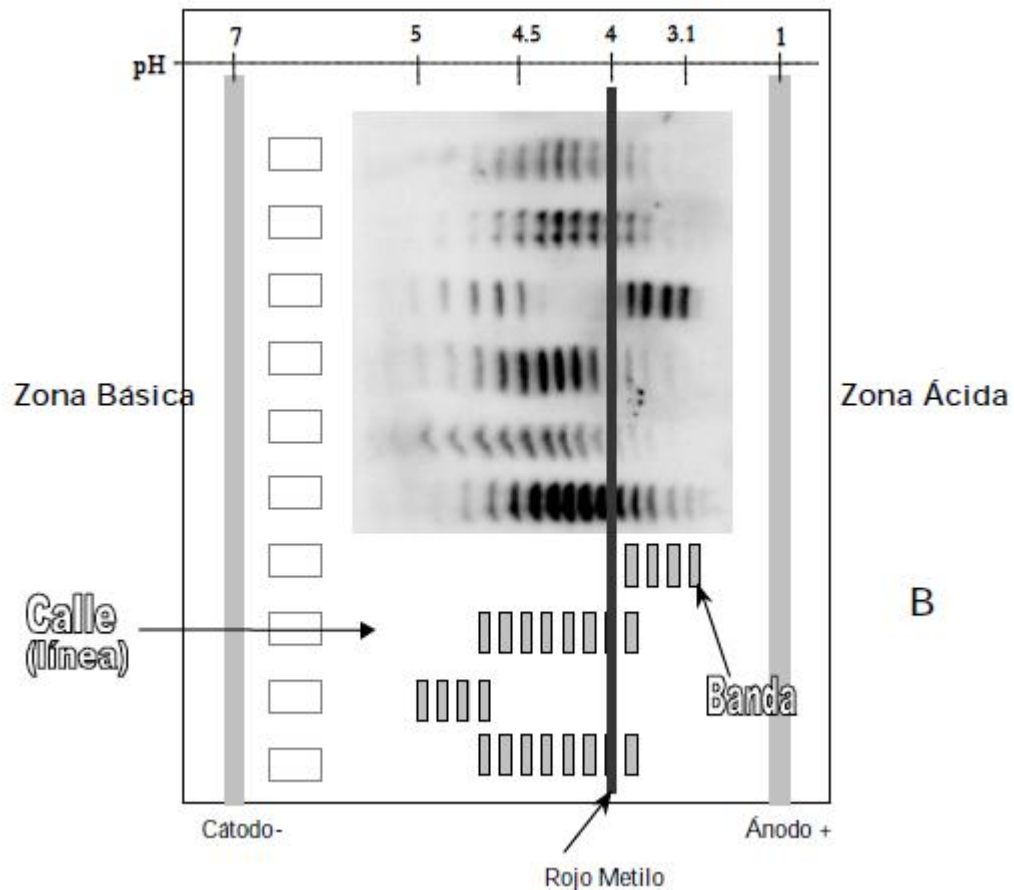


Figura 30. Migración electroforética de las isoformas de EPO en muestras de orina y estándares (en función de su pI y del pH del medio), mediante la técnica de isoelectroenfoque.

Extraída de la bibliografía 32

10.2.2. Electroforesis 2D

Se trata de una técnica que combina IEF con SDS-PAGE. En el primer paso, las proteínas se separan en relación a su carga según el IEF.

Posteriormente, son transferidas a un gel SDS-PAGE, en el cual se separan en función de su masa molecular.

Este método cuenta con dos ventajas con respecto a otros. La primera es que su resolución es muy alta debido a la separación bidimensional de las proteínas; y la segunda es su alta velocidad (5, 19).

10.2.3. Modelo ON/OFF

Uno de los avances más importantes lo constituye el modelo ON/OFF, probado en 1999 en 30 clubes de atletas de nivel a los que se les administró rhuEPO.

El modelo ON incluye los siguientes parámetros: hematocrito, EPO en suero, receptor soluble de transferrina y porcentajes de hematocrito y macrocitos. Los resultados son muy buenos, dado que el dopaje se detecta durante las fases tempranas de su administración.

Por otro lado, el modelo OFF es un modelo más efectivo en las fases finales del periodo de dopaje. Incluye el hematocrito, número de reticulocitos y EPO en suero, identificando entre un 67 y un 72% de los falsos positivos existentes.

La gran diferencia entre un método y el otro es que el ON es capaz de detectar las muestras de EPO en una ventana de tiempo corta (aproximadamente 48 horas tras la inyección), mientras que el modelo OFF permite una detección incluso dos semanas después de que el atleta se haya administrado EPO (4, 19).

10.2.4. Método cromatográfico

Es un método utilizado para separar compuestos volátiles. En este proceso los compuestos separados van a la fuente de iones de un detector

donde se ionizan. El cociente de su masa-carga es proporcional a los iones intactos.

Con este método se observan las diferencias en las estructuras glucídicas de las proteínas recombinantes, mediante detección fluorescente de los oligosacáridos (19).

10.2.5. Métodos de espectrometría de masas

Se trata de un método de ionización suave cuyo objetivo es el de ionizar y transferir macromoléculas biológicas, como es el caso de las glicoproteínas.

Junto al HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), es uno de los métodos más usados para la diferenciación de rhuEPO y EPOe, y su consiguiente detección en el dopaje (19).

10.2.6. Método de detección por EPO MAIIA

La MAIIA (*membrane assisted isoform immunoassay*) es una de las técnicas más prometedoras, en lo que a detección de rhuEPO se refiere, desarrollada en 2012 por la compañía sueca de biotecnología MAIIA en Uppsala. Consiste en la combinación de dos técnicas, una técnica cromatográfica de membrana básica (proceso que busca la separación de isoformas de una proteína), junto a una técnica de inmunoensayo para la detección de las isoformas separadas (4, 19, 37).

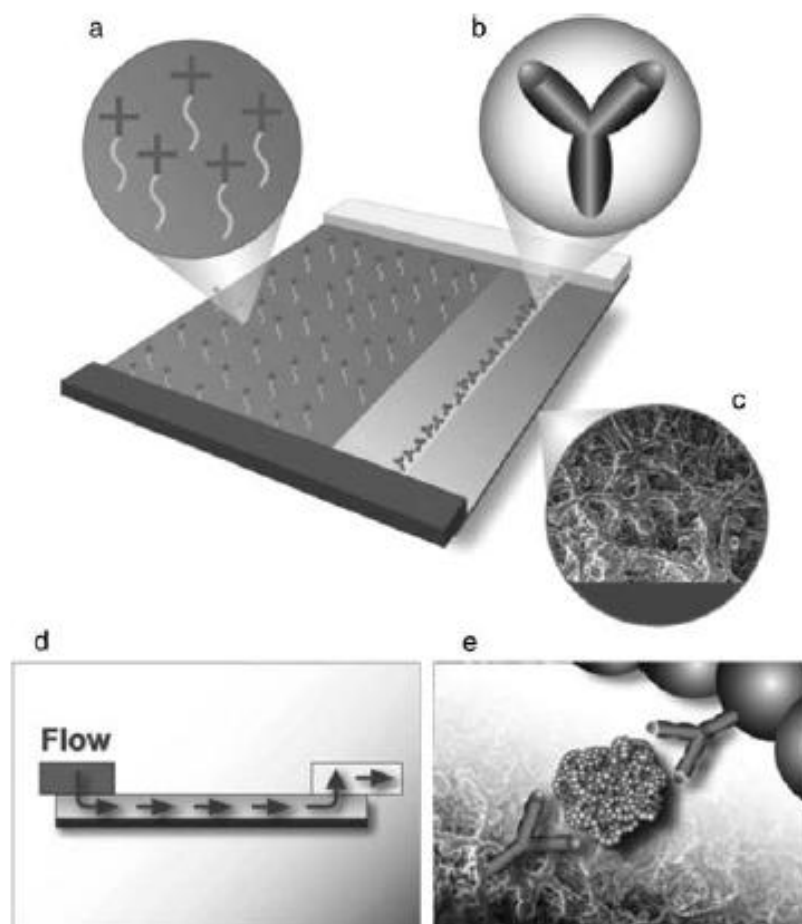


Figura 31. Esquema del método MAIA.

Extraída la bibliografía 19

Este método se utiliza para distinguir proteínas recombinantes u hormonas peptídicas de sus correspondientes proteínas endógenas, mediante las diferencias en sus carbohidratos. Tan solo se requiere una pequeña muestra de la isoforma para detectar una posibilidad de dopaje.

Además de tener más sensibilidad, la MAIA es más rápida y barata que la IEF que usa la WADA. Se espera que esto innove la tecnología hacia una alternativa distinta al IEF (37).

10.2.7. ABP (Pasaporte hematológico)

Trata de establecer perfiles hematológicos individuales, comparando valores de parámetros sanguíneos y factores heterogéneos, como la edad, sexo... (4, 37).

El ABP es un sistema multi-pasos, donde el primer paso se lleva a cabo mediante un sistema software. Después una serie de expertos evalúan los perfiles de la sangre marcada como anormal por el software ABP y sólo si los expertos llegan a la conclusión de que haya podido haber dopaje se abre un proceso disciplinar.

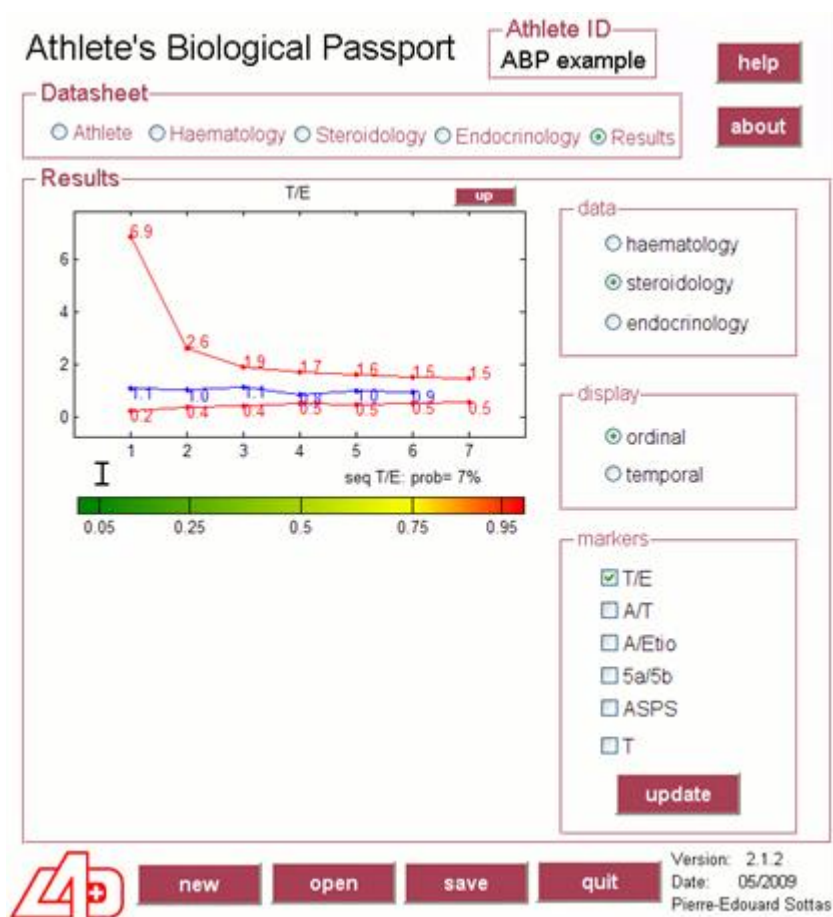


Figura 32. Ejemplo de un ABP.

Extraída de <http://www.doping.chuv.ch>

El problema de este método es que solo presenta una sensibilidad del 20% cuando se trata de dopaje mediante transferencia de sangre autóloga. Por esta razón se hace necesaria la presencia de un grupo de expertos para determinar si hay dopaje o no (37).

La UCI fue la primera federación en imponer este pasaporte biológico como avance en el mundo del dopaje. La utilización de este método podría ayudar a eliminar los casos de perfiles de rhuEPO indetectable (4, 37).

10.2.8. Detección EPO CERA

La EPO CERA (*Continuous Erythropoietin Receptor Activator*) es un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA) de tercera generación, que posee la ventaja de permanecer más tiempo en el organismo, reduciendo de esta manera su administración, y de excretarse menos en orina, dificultando así su detección.

En la actualidad se ha desarrollado un método que combina sangre y orina para la detección de esta proteína, aunque aún está en prueba y no se realiza en todos los laboratorios (2).

10.2.9. Detección de la transferencia de genes

El dopaje genético consiste en la transferencia del gen que codifica para la eritropoyetina, pudiéndose introducir en el cuerpo a través de un adenovirus y, mediante un factor de transcripción sensible al oxígeno, comenzar a sintetizarla. La proteína permanece más tiempo en la circulación, aumentando de esta forma su efecto biológico.

Se trata de un método prácticamente indetectable y cada vez más estudiado. Solamente se detecta mediante biopsia, que únicamente se realiza si han dado positivos por otros métodos de detección. Cuenta también con el inconveniente de ser un método caro (24).

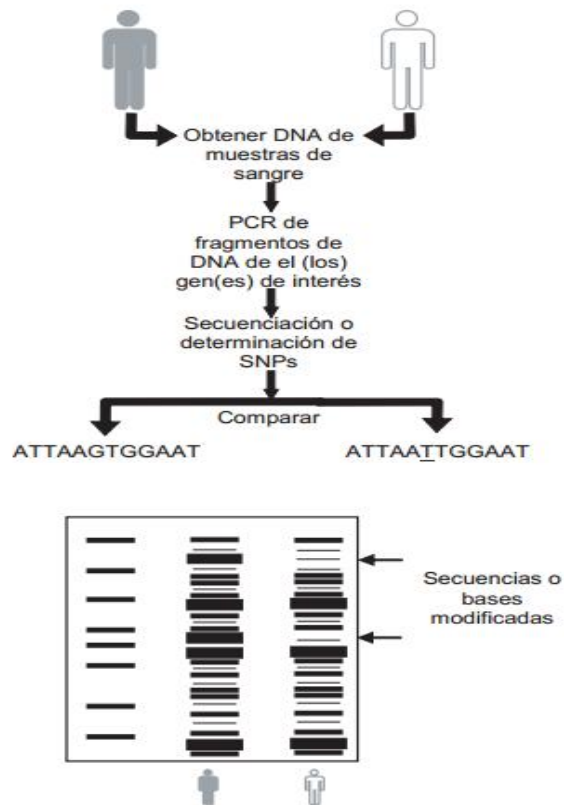


Figura 33. Diagnóstico molecular

Extraída de buscador Google

Las pruebas moleculares nos permiten detectar la diferencia entre un genoma “normal” y un genoma “alterado”. El desarrollo de estas pruebas se puede resumir en los siguientes pasos (Figura 33):

- 1) Extracción de DNA o RNA de muestras de sangre o tejido del sujeto de estudio;
- 2) Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*, PCR).
- 3) Estudio de las secuencias de interés mediante sondas, marcadores, polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) o polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphisms*, RFLPs), entre otros.

10.2.10. Otros métodos.

Otros métodos de detección serían la respuesta inmune a los vectores virales, los microarrays de DNA y los perfiles proteómicos. El primero no es uno de los métodos más utilizados, ya que la detección de vectores de dopaje es muy difícil, debido a la corta vida de los mismos, y además no es concluyente, ya que el deportista puede haberse infectado por otra fuente distinta (9, 25).

Los microarrays de DNA y los perfiles proteómicos son otro método de detección, en el cual se descubre el dopaje a través de la habilidad de evaluar el perfil de expresión de los genes endógenos y mediante la observación de cambios en perfiles proteicos, conociéndose previamente el perfil proteómico del deportista (25).

11. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para la realización de este trabajo de fin de grado, han sido cuatro las principales de información consultadas:

- Base de datos de Biomedicina PubMed.
- Literatura gris de Bioquímica y Fisiología.
- Artículos científicos proporcionados por la tutora del trabajo.
- Artículos científicos encontrados en Google Académico.

La búsqueda de artículos, dada la estructura del trabajo, se ha llevado a cabo en dos fases. La primera de ellas se centró en la búsqueda de artículos para la introducción, recabándose información sobre el dopaje, su historia y el uso de la EPO. La segunda fase de búsqueda sirvió para la realización del cuerpo del trabajo, así como para orientarlo hacia la proteína objeto de estudio, la eritropoyetina.

Al tratarse de un trabajo científico, en el que la bioquímica es el aspecto fundamental, la principal base de datos (BD) utilizada para encontrar la información es PubMed. Se trata de la BD de biomedicina más completa, rigurosa y actualizada. Dispone de un enlace (*Clinical Trials*) para acceder a todos los ensayos clínicos (ECAs) que se están realizando en la actualidad. A pesar de ello, se han realizado búsquedas en otras bases de datos de fisioterapia como Cochrane o PeDro, aunque sin éxito alguno.

Para desarrollar la fase inicial de búsqueda del trabajo (es decir la de la introducción), se han realizado búsquedas sobre todo en Google Académico, introduciéndose los términos de “historia del dopaje” y “definición del dopaje”. Dada la gran cantidad de resultados encontrados, se establecieron una serie de restricciones para seleccionar la información más adecuada: que los trabajos fueran del año 2000 en adelante, que superaran la escala Caspe... seleccionándose finalmente cuatro artículos; también se seleccionaron dos libros para completar los datos encontrados en los artículos.

Además de esos artículos y de la literatura gris, utilicé dos artículos científicos proporcionados por mi tutora. Para el aspecto del dopaje inicialmente

consulté la página de la WADA, con objeto de conocer cuáles son actualmente las sustancias dopantes y los métodos prohibidos, datos que están recogidos en una lista publicada a principios de 2013.

En lo que se refiere a la segunda fase de búsqueda de información, centrada en el desarrollo del cuerpo del trabajo, la principal fuente de información fue el PubMed y, dentro de éste, el apartado dedicado a los ECAs. También se han empleado algunos artículos con evidencia científica suficiente del Google Académico. Además de esto ha sido necesario el uso de dos libros de la Biblioteca de Ciencias de la Salud de la UAH (Lehninger –Bioquímica- y Sylverthorn –Fisiología-) para completar la información buscada, así como algunos artículos más proporcionados por la tutora de este trabajo de fin de grado.

La primera búsqueda realizada en PubMed se hizo introduciendo el término “*erythropoietin*” (término principal del trabajo), pero la cantidad de resultados obtenidos fue de 25921 artículos. Para acotar el número de resultados y facilitar la búsqueda, ésta se realizó en el buscador MeSH con el término de búsqueda inicial, obteniendo finalmente 14 resultados; de todos éstos se utilizó solamente uno de ellos, por ser el más adecuado y completo de todos.

Una vez se introduce este término en el buscador MeSH, se van introduciendo otros encabezados a la búsqueda del término principal, para realizar una búsqueda completa y precisa sobre el tema que se quiere abordar en el trabajo. En el caso de añadir el subtérmino “*diagnostic use*” se encuentran 17 resultados, de los cuales solamente uno de ellos cumple los requisitos necesarios para la realización del trabajo; mientras que en el caso de “*contraindications*” se encuentran 16 resultados, siendo también solo uno el que utilizamos en nuestro estudio.

En el caso de añadir “*biosynthesis*” el resultado es algo mayor (1396 resultados), por lo que en este caso se introducen los operadores booleanos para acotar los resultados; el operador utilizado es “AND”. Este operador se utiliza con otros aspectos del tema de estudio. En el caso de añadir “*adverse effects*” se encuentran 15 resultados siendo útiles tan solo dos de ellos. Cuando se combina la palabra clave “*erythropoietin*” con más de un término, la búsqueda es aún más completa; esto se realiza con “*biosynthesis*” y “*therapeutic use*”, los resultados obtenidos son 121, de los cuales dos son consultados a lo largo de todo el trabajo.

Además del empleo del Pubmed para la búsqueda de artículos científicos, esta base de datos ha sido muy útil también para consultar los ECAs y así poder conocer las indicaciones clínicas de la eritropoyetina. De los 602 ensayos clínicos encontrados, se han analizado los 100 primeros para poder esclarecer el uso terapéutico de esta proteína; la mayoría de estos ensayos ya se han completado y alguno de ellos está en fase III (prácticamente acabado).

A parte del PubMed, también se ha recurrido a la búsqueda de información mediante el Google Académico, siempre cumpliendo con los requisitos de ser trabajos publicados con posterioridad al año 2000, a excepción de un artículo bastante completo, y de tener una base científica probada. Al tratarse de un tema que se encuentra en continua evolución, muchos de los artículos no son revisiones si no artículos científicos que nos explican el mecanismo molecular de esta proteína (EPO) y sus características. A pesar de ello, sí se han utilizado revisiones que estaban sujetas a los aspectos evaluados en la escala Caspe; todas han de tener resultados en los que se pueda confiar, que han de aparecer reflejados en esos estudios, y los datos extraídos del artículo han sido útiles para el desarrollo del trabajo.

Destacar que dos artículos, “Fundamento de la reacción de la polimerasa” y “Terapia génica”, se han encontrado en un libro virtual.

Por último, también se ha efectuado una búsqueda manual en la Biblioteca de Ciencias de la Salud. En ésta se han recogido dos ejemplares de libros, los ya citados “Lehninger” (de Bioquímica) y “Sylverthorn” (de Fisiología). Estos se han utilizado en la introducción de muchos aspectos del trabajo y para abordar la eritropoyetina desde el punto de vista de las dos ciencias, tanto desde la bioquímica como desde la fisiología respiratoria.

Teniendo en cuenta todos los aspectos reflejados a lo largo de la metodología del trabajo, se han llevado a cabo unos criterios de inclusión y de exclusión para la selección de la mejor bibliografía posible.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Referencias bibliográficas con bibliografía y base científica probada.	Artículos publicados anteriormente al año 2000 (a excepción de uno).
Artículos con la proteína eritropoyetina (<i>erythropoietin</i>) o dopaje (<i>doping</i>) como palabras clave.	Referencias escritas en idiomas diferentes al inglés o el español.
Referencias bibliográficas relacionadas con el deporte y con cómo afecta el dopaje en la práctica deportiva.	Artículos que no han cumplido los tres aspectos evaluados en la escala Caspe.

Tabla 6: Criterios de inclusión y de exclusión de las referencias bibliográficas utilizadas a lo largo del TFG.

Llevando a cabo este riguroso proceso de selección de bibliografía se obtiene un total de 36 referencias, las cuales son empleadas para la realización de los diferentes puntos de los que se encuentra compuesto el trabajo. Las mismas referencias se citan en varios puntos del mismo; debido a lo completas que son, aportan información sobre más de un aspecto. De esta manera se ha hecho una búsqueda mucho más eficiente y se ha realizado una revisión compuesta por menos referencias bibliográficas pero mucho más completas y de calidad.

12. CONCLUSIONES.

El propósito que se ha tratado de lograr con este trabajo de fin de grado, ha sido el de concienciar sobre los efectos perjudiciales del dopaje en el ser humano. Y denunciar que el uso y abuso de estas moléculas en el ámbito deportivo degradan los principios más elevados de la práctica del deporte. Para ello se ha abordado el fundamento bioquímico del dopaje con EPO.

En el trabajo se han ido detallando todos los aspectos moleculares relacionados con esta hormona. Estructura y biosíntesis, acciones biológicas, factores que modulan su producción, moléculas derivadas, indicaciones clínicas, efectos adversos y métodos de detección, han sido algunos de los puntos tratados en la memoria. Así como las estrategias existentes en el dopaje con EPO, basadas en la transferencia de genes y en la administración de proteínas recombinantes; conceptos que un profesional de las Ciencias de la Salud tiene que conocer.

En base a ello podemos extraer las siguientes conclusiones:

La EPO es una proteína cuya función principal es la de la estimulación de la eritropoyesis, de ahí su uso en el ámbito sanitario y en el deportivo como agente dopante (1, 2).

En lo que se refiere al ámbito sanitario, esta proteína se utiliza para el tratamiento de múltiples anemias destacando la asociada a la insuficiencia (33).

En el ámbito deportivo, se utiliza de manera ilegal con objeto de mejorar la capacidad física de los deportistas. La propiedad que esta proteína posee de aumentar el aporte de O₂ a los músculos propicia su uso en competiciones de alta resistencia (5). Es imprescindible conocer los graves efectos adversos que acompañan a la administración de esta proteína, como es el caso de la aparición de cáncer (34, 37).

El conocimiento molecular de los factores que modulan la producción de EPOe, permite comprender otras estrategias de dopaje distintas a la administración

de la hormona o a la transfusión de su gen codificante, tales como el entrenamiento en altura o el uso de las cámaras hipobáricas.

Cada día son más sensibles las técnicas de control antidopaje usadas por el COI para acabar de una vez con esta oleada de casos de deportistas “ilegales” en la competición. Se han mejorado los métodos de detección de las sustancias dopantes y cada vez son más habituales los controles en las competiciones (4, 19).

Debido a la mejora en el sistema antidopaje, se ha recurrido a la administración de otros agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESAs) que son capaces de unirse al receptor de la EPO. Estas moléculas, químicamente modificadas, presentan un efecto más duradero y son más difíciles de detectar. Dichos agentes se están diseñando para el ámbito sanitario, pero se utilizan mal en el ámbito deportivo (4, 31).

Muchos deportistas no cuentan con la información suficiente para comprender los riesgos que conlleva el dopaje con EPO o con cualquier otra molécula. Es fundamental que alguien cercano a ellos, como el fisioterapeuta, disponga de una formación científica adecuada para valorar los riesgos y concienciar a los deportistas, minimizando el abuso de este tipo de dopaje.

13. **BIBLIOGRAFÍA:**

1. Franklin Bunn H. Erythropoietin. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. [Disponible el 06/03/2013 en URL: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>]
2. Lamon S, Guiraud S, Egli L, Smolander JJ, Jarsch M, Gunnar Stubenrauch K, Hellwig A, Saugy M, Robinson N. A high- throughput test to detect C.E.R.A. doping in blood. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2009; 50: 954-958.
3. Yesalis CE, Bahrke MS. History of doping in sport. International Sports Studies. 2002; 24 (1): 42-76.
4. Barroso O, Mazzoni I, Ravin O. Hormone Abuse in sports: the antidoping perspective. Asian J Androl. 2008; 10 (3): 391-402.
5. Jelkman W. Erythropoiesis Stimulating Agents and Techniques: A challenge for doping analysts. Current Medicinal Chemistry. 2009; 16: 1236-1247.
6. Wilson W, Derse E (Editores). Doping in elite sport. The politics of drugs in the Olympic Movement. USA: Ed Human Kinetics; 2001. Chapter 3 (Difficulties in estimating the prevalence of drug use among athletes).
7. Baron DA, Martin DM, MAgd SA. Doping in sports and it spread to at-risk populations: an international review. World Psychiatry. 2007; 6 (2): 118-123.
8. Bamberger M, Yaeper D. Over the edge: Sports Illustrated. 1997; 86 (15): 60-70.
9. Azzazy ME, Mansour MH, Christenson R. Doping in the recombinant era: Strategies and counterstrategies. Clinical Biochemistry. 2005; 38: 959-965.
10. Guerrero Olazarán M, Cab- Barrera EL, Galán-WWong LJ, Viader Salvadó JM. Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. En: Cruz Suarez LE, Rique Marie D, Nieto López MG, Villarreal D, Sholz U, González M. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII

Simposium Internaciolnal de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.

11. Mas E, Poza J, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R, Rodellar C. Fundamento de la reacción de la polimerasa (PCR). Revista AquTIC, nº 15, Noviembre 2001. [Disponible el 08/03/2013 en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1501/basespcr.htm>
12. Bartlett JMS, Stirling D. A short history of the Polymerase Chain Reaction. En: PCR protocols. 2ª ed. Totowa (New Jersey). Ed: Springer 2003; 226. Capítulo Methods in Molecular biology: 3-6.
13. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 5ª ed. Winsconsin: Editorial Omega; 2008.
14. Argüelles CF, Hernández Zamora E. Dopaje genético: transferencia génica y su posible detección molecular. Gac Méd Mex. 2007; 143 (2): 169-172.
15. Fallahi AA, Ravasi AA, Farhud DD. Genetic Doping and Health Damages. Iran J Public Health. 2011; 40 (1): 1-14.
16. Ronchera-Oms CL, González JM. Terapia génica. En: Farmacia hospitalaria. (Tomo 2) Capítulo 6: 919-927. [Disponible el 06/03/2013 en URL: www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP06.pdf]
17. Jelkman W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. En: Methods in Enzimology. Germany: Ed Elsevier Inc. 2007; 435: 179-197.
18. Jelkmann WW. Molecular Biology of Erythropoietin [revisión]. Internal Medicine. 2004; 43 (8): 649-659.
19. Reichel C, Gmeiner G. Erythropoietin and Analogs. En: Doping in Sports (Handbook of Experimental Pharmacology). Berlín Heidelberg: Ed Springer-Verlag. 2010; 195: 251-294.
20. Elliot S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoiesis: A common mechanism of action. Experimental Hematology. 2008; 36: 1573-1584.

21. S. Elliott. Erythropoiesis – stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *Br J Pharmacol*. 2008. June; 154 (3): 529-541.
22. Jelkmann. W. Regulation of erythropoietin production. *J Physio*. 2011; 589 (6): 1251-1258.
23. Youssoufian, H., Longmore, G., Neumann, D., Yoshimura, A., Lodish, H. Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 81: 2223-2236, 1993.
24. Peñuela OA y Gómez LA. Eritropoyetina: más allá de la proliferación y maduración eritroide. *Revista Médica* 2010. 18 (1): 67-76.
25. Oliveira RS, Collares TF, Smith KR, Collares TV, Seixas FK. The use of genes for performance enhancement: doping or therapy?. *Braz J Med Biol Res*. Diciembre 2011; 44 (12): 1194-1201.
26. Silverthorn DU. Fisiología humana: Un enfoque integrado. 4ª ed. Buenos Aires (Argentina): Ed Médica Panamericana; 2008.
27. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O_2 -regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468-472.
28. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295: 858-861.
29. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O_2 -dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7987-7992.
30. Locatelli F, Del Vecchio L. Erythropoiesis- Stimulating Agents in Renal Medicine. *The Oncologist* 2011; 16 (suppl 3): 19-24.
31. Lasne F., de Ceaurriz J., Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 2000, 405, 635.

32. Blanco Perea R et al. En: Seminario sobre actualización de los procedimientos analíticos de control de dopaje. MEC. Consejo Superior de Deportes. Serie ICd, nº 43, 2006.
33. Redondo de Pedro M, García Lloret T, Cabezón Pérez N, Mundet Olloqui J. Aplicación terapéutica de la eritropoyetina. JANO. Septiembre 2005; 19 (1576): 42-44.
34. Blau AC. Erythropoietin in Cancer: Presumption of Innocence?. STEM CELLS. 2007; 25: 2094-2097.
35. Duleschel D, Mundigl O, Wessner A, Gremse F, Bachmann J, Rodríguez A, Klingmuller U, Jarsch M, Kressling F, Lederle W. Targeted near infrared imaging of the erythropoietin receptor in human lung cancer xenografts. J.Nucl Med. 2012; 53: 304-311.
36. Lundby C, Robach P, Saltin B. The evolving science of detection of “blood doping”. British Journal of Pharmacology. 2012; 165: 1306-1315.
37. Beiter T, Zimmermann M, Fragaso A, Armeano S, Lauer UM, Bitzer M, Su H, Young WL, Neiss AM, Simon P. Establishing a novel single-copy primer-internal intron-spanning PCR (spi PCR) procedure for the direct detection of gene doping. Exerc Immunol Rev. 2008; 14:73-85.